

Joice Moraes Faria Monteiro Belem

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE *HLA-B*51* E SEUS
PRINCIPAIS ALELOS EM PACIENTE BRASILEIROS COM
DOENÇA DE BEHÇET**

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Reumatologia
da Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde Aplicada em
Reumatologia.

São Paulo

2019

Joice Moraes Faria Monteiro Belem

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE *HLA-B*51* E SEUS
PRINCIPAIS ALELOS EM PACIENTE BRASILEIROS COM
DOENÇA DE BEHÇET**

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Reumatologia
da Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde Aplicada em
Reumatologia.

Orientador Prof. Dr. : Alexandre
Wagner Silva de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo
Coelho Andrade

São Paulo

2019

Belem, Joice M. F. M.

Avaliação da frequência de *HLA-B*51* e seus principais alelos em paciente brasileiros com doença de behçet. Joice Moraes Faria Monteiro Belem – São Paulo, 2019.

XVIII, 92f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.
Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Ciências aplicada a Reumatologia.

Título em inglês: The frequency of HLA-B*51 and its main
alleles in Brazilian patients with Behçet's disease.

1. Doença de Behçet, 2. Brasil, 3. frequência do alelo,
4. HLA, 5. HLA-B*51, 6. análise de sequenciamento de DNA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DISCIPLINA DE REUMATOLOGIA

Chefe do departamento: Prof. Dr. Alvaro Pacheco e Silva Filho

Coordenador do curso de pós-graduação: Charles Helden de Moura Castro

JOICE MORAES FARIA MONTEIRO BELEM

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE *HLA-B*51* E SEUS
PRINCIPAIS ALELOS EM PACIENTE BRASILEIROS COM
DOENÇA DE BEHÇET**

PRESIDENTE DA BANCA

Prof^a. Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

BANCA EXAMINADORA

Daniela Maira Cardozo

Universidade de Campinas (UNICAMP)

Zoraida Sachetto

Universidade de Campinas (UNICAMP)

Leandro Lara do Prado

Universidade de São Paulo (USP)

SUPLENTE

Sandro Félix Perazzio

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Este trabalho foi realizado com o auxílio do CNPq e do Laboratório Fleury.

DEDICATÓRIA

A todos os indivíduos que sofrem de doenças crônicas. A pesquisa e o estudo das patologias humanas só têm sentido se resultarem, de forma direta ou indireta, em melhorias para a vida de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas.

Ao meu grande amor, Renan, por todo incentivo e apoio.

À minha família, pelo amor e alicerce.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre, por ser um grande exemplo de médico e pesquisador, capaz de compartilhar tanto conhecimento de forma tão generosa e humilde. Durante todo esse tempo trabalhando ao seu lado cresci não só como pesquisadora, mas também como clínica e como pessoa.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luís Eduardo Coelho Andrade pela oportunidade de desenvolver esse projeto, sempre abrindo portas para a pesquisa científica.

Aos meus amigos do ambulatório de vasculites Bruna, Fred, Isa e ultimamente Mariana e Luís pelas discussões, pelas aulas, pelo aprendizado em meio a risadas e pela amizade que vai além da pós-graduação.

A todos do ambulatório de Artrite Reumatóide, Dr. Daniel, Dr. Charles, Dr. Fábio e Laura, por tornar toda a caminhada mais leve e divertida.

A Ana Maria Fraga, por me introduzir no mundo da “bancada” do laboratório, juntamente com todos do P&D.

Ao meu colega Sandro Félix Perazzio por me apresentar aos pacientes com Doença de Behçet e por me auxiliar no início de tudo.

À Teresa e Silvia pelo suporte técnico, pelo auxílio na coleta e por todas nossas conversas.

A Eni, pela colaboração e ajuda com a parte burocrática da pós-graduação.

Ao Fleury e CNPq pelo apoio financeiro e por acreditarem no estudo.

Sumário

Dedicatória	
Agradecimentos	
Sumário	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Quadros	xii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvii
1- Introdução	19
1.1- Doença de Behçet	20
1.2- Genética da Doença de Behçet	25
2- Justificativa	33
3- Hipóteses	35
4- Objetivos	37
5- Pacientes e Métodos	39
5.1- Pacientes e Controles	40
5.2- Identificação do <i>HLA</i>	42
5.2.1- Isolamento do DNA	42
5.2.2- Amplificação por PCR da região polimórfica para posterior sequenciamento	43
5.2.3- Gel de agarose a 2% para análise dos produtos de PCR	44
5.2.4- Sequenciamento genético do <i>HLA-B*51</i>	45
5.3- Análise Estatística	46
6- Resultados	47
6.1- Dados Demográficos	48
6.2- Manifestações Clínicas da Doença de Behçet	49
6.3- Presença do <i>HLA-B*51</i> e seus subtipos principais em pacientes com doença de Behçet e em controles saudáveis	50

6.3.1 Subtipos do <i>HLA-B*51</i> em pacientes com doença de Behçet e em controles saudáveis	50
6.4- Dados demográficos e manifestações clínicas em pacientes com doença de Behçet e a presença do <i>HLA-B*51</i>	51
6.4.1- Dados demográficos e manifestações clínicas em pacientes com doença de Behçet e a presença de <i>HLA-B*51:01</i>	53
6.4.2- Dados demográficos e características clínicas em pacientes com doença de Behçet e a presença de <i>HLA-B*51:08</i>	55
6.5- Análises de regressão logística uni e multivariadas	57
6.5.1- Análises de regressão logística uni e multivariadas com <i>HLA-B*51</i>	57
6.5.2- Análises de regressão logística uni e multivariadas com <i>HLA-B*51:01</i>	59
6.5.2- Análises de regressão logística uni e multivariadas com <i>HLA-B*51:08</i>	60
7- Discussão	62
8- Conclusão	69
9- Referências	71
Anexos	85

Lista de Figuras

Figura 1	Imagem dos produtos da reação de PCR após separação eletroforética em gel de agarose a 2%.	45
Figura 2	Comparação entre pacientes e controles quanto à presença do <i>HLA-B*51</i> .	50
Figura 3	Frequência dos subtipos do <i>HLA-B*51</i> nos pacientes com doença de Behçet e no grupo controle.	51

Lista de Quadros

Quadro 1	Critérios de diagnósticos para doença de Behçet (ISG).	24
Quadro 2	Critérios Internacionais para a Doença de Behçet (ICBD).	25
Quadro 3	Prevalência da DB e de <i>HLA-B*51</i> em pacientes e controles saudáveis de diferentes grupos populacionais.	28
Quadro 4	<i>Primers</i> utilizados na reação de PCR para amplificação do trecho de interesse <i>B*51-01A</i> e <i>B*51-24</i> .	43
Quadro 5	Protocolo de ciclagem utilizado para a PCR.	44

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados demográficos dos pacientes e controles incluídos no estudo.	48
Tabela 2	Frequência das manifestações clínicas dos pacientes com DB avaliados no estudo.	49
Tabela 3	Comparação entre as características demográficas em pacientes com doença de Behçet e a presença do <i>HLA-B*51</i> .	52
Tabela 4	Comparação entre manifestações clínicas da doença de Behçet e <i>HLA-B*51</i> .	53
Tabela 5	Comparação entre as características demográficas em pacientes com doença de Behçet e <i>HLA-B*51:01</i> .	54
Tabela 6	Manifestações clínicas da doença de Behçet e <i>HLA-B*51:01</i> .	55
Tabela 7	Características demográficas em pacientes com doença de Behçet e <i>HLA-B*51:08</i> .	56
Tabela 8	Manifestações clínicas da doença de Behçet e <i>HLA-B*51</i> .	57
Tabela 9	Análise univariada e multivariada para associações entre variáveis demográficas, presença de <i>HLA-B*51</i> e doença de Behçet.	58
Tabela 10	Análise multivariada para avaliar o risco de se desenvolver manifestações neurológicas entre os pacientes com doença de Behçet.	59
Tabela 11	Análise multivariada para o risco de desenvolver manifestações oculares entre os pacientes com doença de Behçet.	60
Tabela 12	Análise multivariada para o risco de desenvolver manifestações vasculares entre os pacientes com doença de Behçet.	61

Lista de Abreviaturas

BD	<i>Behcet's disease</i>
Bp	Pares de base
DB	Doença de Behçet
EPM	Escola Paulista de Medicina
ERAP1	<i>Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1</i>
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC95	Intervalo de confiança de 95%
ICBD	<i>International Criteria for Behçet's Disease</i>
ISG	<i>International Study Group</i>
OR	Odds Ratio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UNICAMP	Universidade de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

Resumo

Introdução. A doença de Behçet (DB) é uma doença inflamatória sistêmica que se caracteriza por episódios recorrentes de úlceras orais e genitais, lesões cutâneas e envolvimento ocular, articular, intestinal, neurológico e/ou vascular. O *HLA-B*51*, um subtipo do *HLA-B*5*, é considerado o marcador genético mais associado à DB, principalmente em países da rota da seda, onde a prevalência varia de 40-80%, enquanto sua prevalência é de apenas 13% em indivíduos caucasianos com DB. Não se sabe qual a frequência do *HLA-B*51* e de seus subtipos em pacientes brasileiros com DB, não são conhecidas associações entre *HLA-B*51* e seus subtipos com o risco de se desenvolver DB em nossa população. **Objetivos.** Avaliar a frequência do *HLA-B*51* em pacientes brasileiros com DB e comparar a controles saudáveis; avaliar se há associação entre a presença dos subtipos *HLA-B*51:01* e *HLA-B*51:08* e maior risco de DB na população brasileira; avaliar se há associação negativa entre a presença de *HLA-B*51:07* e DB em indivíduos brasileiros, além de avaliar a associação entre a presença do *HLA-B*51* e seus subtipos com manifestações clínicas específicas da DB. **Pacientes e métodos.** Realizamos estudo transversal com pacientes com DB e controles saudáveis. A presença de *HLA-B*51* foi investigada por reação da cadeia da polimerase (PCR-SSP). Posteriormente, amostras positivas para *HLA-B*51* foram submetidas ao sequenciamento genético pelo método Sanger para identificar os subtipos do *HLA-B*51*. **Resultados.** Oitenta e três pacientes e 258 controles foram avaliados. *HLA-B*51* foi encontrado em 30,1% dos pacientes com DB e em 15,5% do grupo controle ($p = 0,003$). Os principais subtipos identificados entre os pacientes com DB, em ordem decrescente foram *HLA-B*51:01* (18,1%), *HLA-B*51:08* (6,0%), *HLA-B*51:22* (2,4%), *HLA-B*51:29* (2,4%) e *HLA-B*51:02* (1,2%). Enquanto o *HLA-B*51:01* (12,0%) e *HLA-B*51:55* (1,2%) foram mais frequentes no grupo controle. O *HLA-B*51* foi menos encontrado em pacientes com envolvimento neurológico (8,0% vs. 29,3%; $p = 0,034$), enquanto *HLA-B*51:01* esteve presente principalmente em pacientes com manifestações oculares (93,3% vs. 60,3%; $p = 0,014$). Nenhum paciente com DB e com quadro neurológico ou vascular apresentaram *HLA-B*51:01*. *HLA-B*51:08* foi mais frequente em pacientes com manifestações vasculares (60,0% vs. 15,4%; $p =$

0,012). Na análise multivariada, *HLA-B*51* foi um fator de risco independente para DB (OR = 2,410; IC95: 1,332-4,361; $p = 0,004$) e *HLA-B*51:08* teve uma associação independente com manifestações vasculares na DB (OR = 14,843; 95%CI: 1,550 – 142,115; $p = 0,019$). As demais associações não se confirmaram na análise multivariada. **Conclusões.** A prevalência do *HLA-B*51* é maior entre pacientes brasileiros com DB comparado ao grupo controle, e esse gene foi um fator de risco para o desenvolvimento da doença. O *HLA-B*51:01* foi o subtipo mais frequente tanto no grupo de pacientes como no grupo controle e sua presença não foi fator de risco para o desenvolvimento da DB e nem esteve associado às manifestações clínicas da DB. O *HLA-B*51:08* foi associado de forma independente a quadros vasculares na DB. Não foi encontrado o *HLA-B*51:07* entre pacientes e controles nesse estudo.

Palavras-chave – Doença de Behçet, Brasil, frequência do alelo, HLA, *HLA-B*51*, análise de sequenciamento de DNA.

Abstract

Introduction. Behcet's disease (BD) is a systemic inflammatory disease characterized by recurrent oral and genital ulcers, skin lesions and ocular, articular, intestinal, neurological and/or vascular involvement. *HLA-B*51* a split product of *HLA-B*5* is considered the main genetic marker associated with BD, mainly in the Silk Road countries, where its prevalence ranges from 40-80%, while this prevalence is only 13% in Caucasian individuals with BD. The prevalence of *HLA-B*51* and its subtypes is not known in Brazilian patients with BD, and associations between *HLA-B*51* or its subtypes as a risk factor for developing BD in our population is not known as well. **Objective.** To evaluate the prevalence of *HLA-B*51* in Brazilian BD patients and to compare it to healthy controls (HC); to assess whether there is an association between the presence of the subtypes *HLA-B*51:01/HLA-B*51:08* and a higher risk for BD in the Brazilian population; to assess whether there is a negative association between the presence of *HLA-B*51:07* and BD in Brazilian individuals and to evaluate the association between *HLA-B*51* and its subtypes with specific manifestations of BD. **Patients and Methods:** a cross-sectional study was performed with BD patients and HC. *HLA-B*51* was detected by polymerase chain reaction with sequence-specific primer (PCR-SSP). Subsequently, positive samples for *HLA-B*51* underwent genetic sequencing by the Sanger method to detect *HLA-B*51* subtypes. **Results.** Eighty-three BD patients and 258 HC were evaluated. *HLA-B*51* was found in 30.1% of BD patients and in 15.5% of HC ($p = 0.003$). The most prevalent subtypes in BD patients were *HLA-B*51:01* (18.1%), *HLA-B*51:08* (6.0%), *HLA-B*51:22* (2.4%), *HLA-B*51:29* (2.4%) and *HLA-B*51:02* (1.2%), while *HLA-B*51:01* (12.0%) and *HLA-B*51:55* (1.2%) were more prevalent in HC. *HLA-B*51* was less frequently found in patients with neurologic involvement (8.0% vs. 29.3%; $p = 0.034$) while *HLA-B*51:01* was more observed in patients with ocular involvement (93.3% vs. 60.3%; $p = 0.014$). No BD patient with neurologic or vascular involvement presented *HLA-B*51:01*. *HLA-B*51:08* was more frequent in patients with vascular manifestations (60.0% vs. 15.4%; $p = 0.012$). In multivariate analysis, *HLA-B*51* was an independent risk factor for BD (OR = 2.410; 95CI: 1.332-4.361; $p = 0.004$) and *HLA-B*51:08* had an independent association with

vascular manifestations of BD (OR = 14.843; 95CI: 1.550 - 142.115; $p = 0.019$).

Conclusions. The prevalence of *HLA-B*51* is higher in Brazilian BD patients compared with HC, and it is a risk factor to the development of the disease. *HLA-B*51:01* is the subtype most frequent in both BD patients and HC, and it is not a risk factor for BD or for disease manifestations. *HLA-B*51:08* is independently associated with vascular manifestations in BD. No *HLA-B*51:07* was found in BD patients or in HC in this study.

Keywords – Behçet's syndrome, Brazil, allele frequency, HLA, HLA-B*51, DNA sequence analysis.

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- Doença de Behçet

A doença de Behçet (DB) é uma doença inflamatória sistêmica classificada como vasculite de vasos variados e cuja etiologia é desconhecida. A DB se caracteriza por episódios recorrentes de úlceras orais e genitais, lesões cutâneas e envolvimento ocular, articular, intestinal, neurológico e/ou vascular, em diferentes combinações (1). A predominância de gênero na DB sofre influência étnica e geográfica, sendo a DB mais frequente no sexo feminino em localidades como Estados Unidos, Coreia e Brasil, enquanto em países com alta prevalência da doença, como em países do Oriente Médio, na China e no Japão, a DB é mais comum em indivíduos do sexo masculino (2). O diagnóstico da DB é geralmente realizado entre 20 e 40 anos de idade (3–5).

Úlceras orais recorrentes são a principal manifestação da DB, elas podem surgir na gengiva, língua, mucosa jugal e lábios. Mas, a parte externa da mucosa labial é geralmente poupada. As úlceras orais na DB são lesões arredondadas, com bordas eritematosas e finas, cobertas por uma pseudomembrana amarelada (1). Úlceras orais podem ser classificadas em três tipos: maiores, menores ou herpetiformes. Úlceras orais da forma menor têm diâmetro inferior a 1 cm, resolvem em até 10 dias e não deixam cicatrizes, enquanto úlceras orais da forma maior apresentam diâmetro superior a 1cm, são bastante dolorosas, profundas e deixam cicatriz. Úlceras orais herpetiformes apresentam 1 a 2mm de diâmetro, são múltiplas e frequentemente coalescem (6). Na DB, as úlceras orais são habitualmente do tipo menor e, na maioria das vezes, são a primeira manifestação da DB (7,8).

Na DB, as úlceras genitais apresentam menor recorrência em relação as úlceras orais e surgem preferencialmente no escroto e pênis no homem e na vulva em mulheres. Essa manifestação acomete cerca de 75% dos pacientes com DB, sendo semelhantes às úlceras orais, porém as úlceras genitais têm tamanho maior, são mais profundas, mais dolorosas, têm bordas irregulares e geralmente deixam cicatrizes (7,9). Epidimo-orquite, salpingite e uretrite também são consideradas manifestações inflamatórias urogenitais da DB (10,11).

O envolvimento ocular pode ser a primeira manifestação da DB em cerca de 10% dos pacientes, mas com a evolução da doença, a inflamação ocular acomete de 25 a 75% dos casos, podendo progredir para cegueira, se não tratada de forma adequada (9,12). O envolvimento ocular se dá por comprometimento da úvea e da retina, na forma de uveíte anterior, uveíte posterior, panuveíte e/ou vasculite retiniana. A uveíte anterior se manifesta por dor e hiperemia ocular, sendo reversível espontaneamente, na maioria das vezes, porém essa apresentação ocular pode deixar sequelas, como sinéquias na íris, levando à redução da acuidade visual. O hipópio, definido como acúmulo de pus na câmara anterior do olho, é uma manifestação típica da uveíte anterior na DB, podendo também ser eventualmente observada em pacientes com espondiloartrites relacionadas ao *HLA-B*27*. A uveíte posterior na DB, geralmente evolui com perda progressiva da acuidade visual, sem sinais de hiperemia ocular; quando essa manifestação tem início antes dos 25 anos de idade em homens com DB, apresenta pior prognóstico, podendo evoluir para cegueira irreversível (13). A panuveíte bilateral é a manifestação ocular mais comum na DB (14).

As principais manifestações cutâneas da DB incluem eritema nodoso, lesões acneiformes e a pseudofoliculite. As lesões eritema nodoso-símile são caracterizadas por nodulações cutâneas dolorosas em região anterior das pernas, acometem mais frequentemente mulheres com DB e regredem deixando área de discreta hiperpigmentação na pele. A pseudofoliculite e as lesões acneiformes surgem principalmente em regiões do dorso, pescoço e face, principalmente em homens com DB (15). A patergia é a hiperrreatividade a traumas na pele e esse fenômeno é habitualmente provocado pela inserção de agulha na epiderme e derme, levando ao desenvolvimento de lesão papular ou pustulosa em 24 a 48 horas. Em diferentes estudos realizados no Brasil (16–18), a positividade do teste da patergia é de aproximadamente 22% dos pacientes com DB, essa frequência é superior à positividade encontrada em pacientes com DB de outros países como Inglaterra (5,0%), Itália (11,1%) e Coréia do Sul (15,0%), porém inferior à frequência de 50-75% (18–21). Apesar do fenômeno da patergia ser considerado bastante específico para a DB, ela também pode ser observada em outras doenças como na doença inflamatória

intestinal, pioderma gangrenoso, síndrome de Sweet, síndrome da alça cega e no eritema *elevatum diutinum* (22,23).

O envolvimento articular é observado em até 80% dos pacientes com DB. Essa manifestação pode ser mono ou oligoarticular, e envolve grandes articulações dos membros inferiores. Artrite na DB geralmente não leva ao desenvolvimento de erosões ou deformidades articulares e artralguas são mais comuns do que a artrite propriamente dita (24).

O envolvimento vascular na DB é observado em até 40% dos casos (3,25) e pode comprometer tanto artérias como veias, de grande e de pequeno calibre (26–28). O envolvimento venoso ocorre em 75% dos casos e o arterial em 25% dos pacientes com vâsculo-Behçet (25). A trombose venosa é a manifestação vascular mais comum na DB, sendo observada em 14 a 39% dos casos (29–32). Diferentes leitos venosos são acometidos na DB, incluindo veia cava superior e veia cava inferior, veias dos membros inferiores, vasos supra-hepáticos e cavidades cardíacas. Entre os pacientes que apresentam trombose venosa na DB, a trombose venosa profunda é observada em até 95,6% dos casos (33). A associação de trombose venosa com aneurisma de artérias pulmonares foi demonstrada em estudo realizado na Turquia, onde 74% de pacientes com aneurismas de artérias pulmonares também desenvolveram evento trombótico venoso (34). Embolia pulmonar e síndrome de Budd-Chiari são causas de mortalidade em até 17% dos pacientes com DB (35).

A frequência de envolvimento do trato gastrointestinal na DB é variável em diferentes países, oscilando de 2% entre os turcos a 60% entre os japoneses (36–41). No Brasil, o envolvimento gastrointestinal varia de 1,2 a 6,6% (17,42,43). As manifestações costumam ocorrer cerca de 4,5 a 6 anos após o surgimento das úlceras orais, e se apresentam como náuseas, dores abdominais, vômitos, diarreia e até enterorragia (44). O segmento íleo-cecal é o mais acometido na DB, no entanto qualquer porção do trato gastrointestinal pode ser envolvida (45).

Na DB, o sistema nervoso central é acometido em 5 a 30% dos pacientes (46–49) e este envolvimento pode ser dividido em duas principais formas: envolvimento parenquimatosos, que inclui manifestações de tronco cerebral, hemisféricos cerebrais, medula espinhal e meningoencefalite; e

envolvimento não parenquimatoso, que inclui envolvimento vascular, principalmente a trombose venosa cerebral, a síndrome de pseudotumor cerebral e a meningite asséptica (50,51). O envolvimento neurológico representa fator de mau prognóstico na DB e a forma mais típica de acometimento do sistema nervoso central é a rombencefalite (52).

Até 1990, cinco diferentes critérios de diagnóstico foram elaborados para a DB: critérios de Mason & Barnes, critérios do Comitê Japonês de Pesquisa em DB, critérios de O'Duffy, critérios de Cheng & Zhang e os critérios de Dilsen (53–56). Em 1990, foram desenvolvidos os critérios de diagnóstico do *International Study Group* (ISG) em DB (57), esses critérios apresentam alta especificidade para diagnosticar a doença e têm sido amplamente utilizados, tanto na prática clínica, quanto na inclusão de pacientes com DB para estudos que avaliam epidemiologia, fisiopatologia e terapêutica (Quadro 1). Porém, um grande problema para a utilização dos critérios do ISG, é a obrigatoriedade da presença de úlceras orais recorrentes para se diagnosticar a DB (57). Recentemente, foram desenvolvidos os critérios internacionais de diagnóstico da DB, conhecidos como critérios ICBD (*International Criteria for Behçet's Disease*) (58,59) com o objetivo de se obter uma maior sensibilidade no reconhecimento da DB, pois em relação aos critérios de diagnóstico do ISG para DB, os critérios do ICBD não exigem a presença de úlceras orais recorrentes para se diagnosticar a doença (Quadro 2).

Quadro 1 – Critérios de diagnósticos para doença de Behçet (ISG) (57).

<i>Critério maior</i>	Descrição
Úlceras orais recorrentes	Úlceras aftosas observadas pelo médico ou pelo paciente, na frequência de pelo menos 3 episódios no intervalo de 12 meses
<i>Critérios menores</i>	
Úlceras genitais	Úlceras ou cicatrizes genitais observadas pelo médico ou paciente
Lesões oculares	Úveíte anterior ou posterior, com células vistas em vítreo a partir da lâmpada de fenda, ou vasculite retiniana documentadas pelo oftalmologista
Lesões cutâneas	Eritema nodoso símile observado por um médico ou paciente, lesões cutâneas papulopustulares ou pseudo-foliculite com características acneiformes observados por um médico
Teste da patergia	Interpretado em 24 a 48 horas por um médico

Para o diagnóstico de DB é necessária a presença de um critério maior e de pelo menos dois critérios menores. Sensibilidade de 46-92% e especificidade de 79,8-99,8% (56,57) .

Quadro 2 – Critérios Internacionais para a Doença de Behçet (ICBD)
(58,59).

Manifestações	Pontuação
Úlceras genitais	2 pontos
Lesões oculares (uveíte anterior, uveíte posterior ou vasculite retiniana)	2 pontos
Úlceras orais	2 pontos
Lesões cutâneas (pseudofoliculites e eritema nodoso símile)	1 ponto
Lesões vasculares (tromboflebitis superficiais, trombose venosa profunda, trombose arterial ou aneurismas)	1 ponto
Teste da patergia	1 ponto

São necessários pelo menos 4 pontos para se fazer o diagnóstico de DB. Sensibilidade de 87,0-96,5% e especificidade de 88,0-97,3%.

1.2- Genética da doença de Behçet

A prevalência de DB é mais elevada em países da antiga rota da seda, que se estende do Mediterrâneo, passando pelo Oriente Médio até a China e o Japão (3). A Turquia é o país que apresenta a maior prevalência da DB (80-420 casos/100.000 habitantes) (60–64). A prevalência geral calculada da DB é de 31,8 casos/100.000 habitantes no Oriente Médio, 4,5 casos/100.000 habitantes em países asiáticos, 5,3 casos/100.000 habitantes no sul da Europa, 2,1 casos/100.000 habitantes no norte da Europa e 3,8 casos/100.000 habitantes na América do Norte/Ilhas Caribenhas (65). A prevalência da DB diminui do Sul para o Norte do continente europeu (60). No Brasil, há três principais séries de casos que avaliaram manifestações clínicas da DB. Cerca de 253 pacientes, acompanhados em 3 centros especializados do país, apresentavam características clínicas semelhantes às aquelas observadas em países do oriente médio, exceto por uma maior prevalência de sintomas neurológicos e oculares (17,42,43). Estudo epidemiológico recente, realizado em 9 centros da região Sudeste do Brasil, especializados no cuidado de pacientes com vasculites, identificou frequência de 35% de DB entre 1.233 pacientes. Portanto, a DB foi a vasculite sistêmica mais frequente em nosso meio (66).

A concordância da DB entre gêmeos monozigóticos já foi relatada, porém em outras duas situações, apenas um dos gêmeos monozigóticos apresentou DB (67). Estudo realizado em gêmeos com DB, observou que a concordância entre eles foi maior para gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos, e a genética foi responsável por 41% para a variação fenotípica (68). Dessa forma, acredita-se que fatores genéticos isoladamente não sejam suficientes para explicar o desenvolvimento da DB e sim a associação de fatores genéticos e ambientais contribuem para a etiopatogenia da DB (1). Imigrantes turcos na Alemanha e imigrantes japoneses na Califórnia apresentam menor prevalência de DB em comparação aos seus respectivos países, porém muito superior à prevalência de DB observada na população local desses países (6,16).

Agentes infecciosos são os fatores ambientais mais associados à DB, a participação de diferentes agentes (p. ex. vírus herpes simples tipo I, eritrovírus B19, micobactérias, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* e *Saccharomyces cerevisiae*) foi investigada em diferentes estudos. Porém, a relevância clínica dessas infecções nunca foi concluída (69,70). Os micro-organismos mais investigados na DB são do gênero *Streptococcus*, devido à alta frequência de infecção de nasofaringe, cáries dentárias e doença periodontal com isolamento desses agentes na DB (71). Além disso, a melhora de manifestações mucocutâneas e articulares com o uso de antibióticos fala a favor da participação de gatilhos bacterianos na patogênese da DB (72,73). Entre as espécies de *Streptococcus*, destaca-se a infecção pelo *Streptococcus sanguinis* na cavidade oral de pacientes com DB, especialmente em condições de higiene oral precária (69–71).

Recentemente, tem-se levantado a possível influência de alterações da microbiota da cavidade oral, da pele ou intestinal na patogênese da DB (74). Todavia, há poucos estudos, até o momento, que avaliaram disbiose da microbiota na DB. Em estudo que incluiu pacientes turcos com DB, sequenciando a região V4 do RNA ribossomal 16S bacteriano na saliva, observou-se que a espécie mais abundante foi o *Haemophilus parainfluenza*, enquanto a espécie bacteriana *Alloprevotella rava* e as espécies do gênero *Leptotrichia* foram menos encontradas (75). A avaliação da microbiota fecal em

pacientes com DB e em controles saudáveis que compartilhavam a mesma dieta e ambiente, por sequenciamento das regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16 rDNA, demonstrou depleção significativa dos gêneros *Roseburia* e *Subdoligranulum* em pacientes em comparação a controles. Além disso, pacientes com DB apresentaram menor produção de butirato em relação a controles, o que reflete a disbiose intestinal na DB. O butirato é uma substância produzida pela flora bacteriana intestinal e que induz a diferenciação de linfócitos T reguladores. Possivelmente, a menor produção de butirato está associada ao desequilíbrio entre a resposta T reguladora e T efetora relacionada à microbiota intestinal na DB (76).

O *HLA-B*51*, um alelo do *HLA-B*5*, é considerado o marcador genético mais associado à DB em diferentes grupos étnicos (77). A prevalência de *HLA-B*51* na DB varia de 40-80% na Turquia e em países da Ásia enquanto sua prevalência é de apenas 13% em indivíduos caucasianos com DB em países ocidentais (78,79). Estima-se que a presença do *HLA-B*51* contribua em até 20% para a susceptibilidade genética da DB (80). Uma meta-análise, que avaliou 78 estudos independentes que incluíram 4.800 pacientes com DB e 16.289 controles, observou que o risco de se desenvolver a DB em portadores de *HLA-B*5/B*51* é 5,78 vezes maior com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) de 5,00-6,67 em relação a indivíduos não portadores desses alelos (81). Informações sobre a prevalência da DB e frequência do *HLA-B*51* em diferentes países são descritos no Quadro 3. Por essa forte associação entre DB e *HLA-B*51*, recentemente foi proposto que a DB fizesse parte de um grupo de doenças denominado MHC-I-opatias, esse grupo também inclui a psoríase com sua associação ao *HLA-C*06:01* e as espondiloartrites que têm associação com o alelo *HLA-B*27*, e todas apresentam interações epistáticas com ERAP1 (*Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1*). Nesse grupo de doenças, há também associação com resposta imune Th17 e proeminente infiltrado neutrofílico em tecidos afetados (82).

Quadro 3 – Prevalência da DB e de *HLA-B*51* em pacientes e controles saudáveis de diferentes grupos populacionais (79,83).

População (região)	Prevalência/100 mil	Frequência de <i>HLA-B*51</i> em controles (%)	Frequência de <i>HLA-B*51</i> em pacientes (%)
Reino Unido			
Escócia	0,27	NR	13**
Yorkshire	0,63	9**	18**
Alemanha			
Alemã	0,55	14	36
Turca	20,75	31	75
Itália			
Régio da Emília	3,8	19	57
China	14	12	56
Turquia*		25	75
Istambul	420	NR	NR
Nordeste	370	NR	26**
Noroeste	20	NR	NR
Espanha			
Espanhóis*	7,5	15	37
Japão			
Região de Hokkaido	30,5	NR	NR
Japoneses*	13,5	14	59
Coreia *	7,3	13	53
Iraque *	17	29	62
Israel			
Israelense*	15,2	NR	NR
Região Norte –	146,4	NR	100**
Druze	26,2	NR	81**
Região Norte – Arab	8,6	NR	72**
Região Norte-Jewish	120.0	NR	83**
Cidade de Taibe			
Egito			
Região de Alexandria	7,6	7	58
Arábia Saudita	20	26	72
Portugal	1,5	NR	75
Itália	3,8	NR	75
Estados Unidos	5,2	NR	0

NR: não relatado; *nacionalmente; ** valor aproximado.

O *HLA-B*51* é um gene bastante polimórfico, que se localiza no braço curto do cromossomo 6 e apresenta mais de 250 subtipos diferentes, definidos pela sequência proteica (84). Entre os alelos do *HLA-B*51*, o *HLA-B*51:01* apresenta maior associação com DB em todos os grupos populacionais

avaliados. O *HLA-B*51:08* é outro alelo também associado a um maior risco de DB no Oriente Médio, Itália, Espanha, Grécia, Turquia e Alemanha (4,85–95). Entretanto, há evidências de que o alelo *HLA-B*51:07* tenha associação negativa com o desenvolvimento da DB em populações turca e alemã (78,79). Entre populações indígenas do Alasca e do Canadá, observa-se alta frequência do *HLA-B*51*, porém a DB é quase inexistente (16). O motivo para tal discrepância é a alta frequência do alelo *HLA-B*51:02:01* que não se associa ao desenvolvimento de DB (79,83). Recentemente, foi observado que o subtipo *HLA-B*51:01:01* se associa à DB em pacientes turcos, jordanianos, japoneses e iranianos, de forma independente e sem desequilíbrio de ligação com outros genes (96).

Estudos de GWAS (*Genome Wide Association Studies*) foram realizados para avaliar associações entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de alelos de frequência menor ($\geq 1\%$) e DB, utilizando diferentes plataformas de genotipagem (97). Ao todo, sete estudos de GWAS foram realizados na DB, incluindo pacientes com DB da Turquia, Europa Ocidental, Oriente Médio, Japão, China e Coreia do Sul no coorte de descoberta, e pacientes com DB da Grécia, Reino Unido, Oriente Médio, Turquia, Japão, China, e Coreia do Sul no coorte de replicação. Nesses estudos, foram avaliados de 311.459 a 779.465 SNPs, com foco principalmente na região do MHC classe I (98–104).

A associação entre a região do *HLA-B* e DB foi confirmada em estudos em diferentes populações, utilizando diferentes SNPs dessa região, que apresentaram significância de GWAS (98,99,103,104). Inclusive quando o *HLA-B*51* foi genotipado em um estudo, sua presença teve associação com DB de forma mais significativa do que qualquer SNP genotipado ($OR = 3,49$; $IC_{95}: 2,95-4,12$; $p = 5,47 \times 10^{-50}$). Além disso, o *HLA-B*51* apresentou desequilíbrio de ligação com SNPs localizados na região entre o *HLA-B* até 62kb de distância entre o centrômero e o gene *MICA*, a frequência do haplótipo foi de 0,321 em pacientes e de 0,144 em controles. O haplótipo idêntico, porém sem o *HLA-B*51*, foi observado em frequência semelhante entre paciente com DB e controles (0,04 para ambos os grupos), o que sugere que a presença do *HLA-B*51* é necessária para a associação entre a região *HLA-B* e DB (98).

Apenas um dos estudos de GWAS, que incluiu pequeno número de pacientes com BD e controles na Turquia (152 vs. 172 indivíduos, respectivamente) não encontrou associação entre DB e polimorfismos na região do *HLA-B*. Nesse estudo, foram encontradas apenas quatro associações com significância de GWAS entre SNPs de genes fora da região do HLA e DB, incluindo *KIAA1529* em 9q22 (rs2061634), *CPVL* em 7p15-p14 (rs317711), *LOC100129342* em 1p32 (rs11206377) e *UBASH3B* em 11q24 (rs4936742) (100).

Em estudo que avaliou pacientes com DB e controles da Turquia (n = 503 e n = 504, respectivamente) e da Itália (n = 144 e n = 1.270, respectivamente), foram genotipados 8.572 SNPs em região estendida do HLA (cromossomo 6: 28.889kb – 33.000kb; hg19) com uma plataforma customizada (Imunochip). Variantes adicionais foram imputadas em pacientes de ambos os países, utilizando-se dados do *1000 Genomes Project*, e a análise de associação genética foi realizada com 33.054 marcadores no coorte de descoberta e 32.819 marcadores no coorte de replicação. Posteriormente, foi feita meta-análise em ambos os coortes, utilizando 24.834 marcadores genotipados ou imputados. Foram encontrados 3 picos de associação com significância de GWAS ($p < 5 \times 10^{-8}$). O SNP rs116799036 teve maior significância (coorte turco com OR: 3,74 e $p = 5,75 \times 10^{-33}$; coorte italiano com OR: 4,14 e $p = 4,93 \times 10^{-23}$; meta-análise com OR: 3,88 e $p = 9,42 \times 10^{-50}$). Esse SNP se localiza a aproximadamente 24kb acima do *HLA-B* e a 16kb do *MICA* (105).

Hughes *et al* ainda realizando análise de imputação de seus dados para os alelos HLA-A, HLA-B, HLA-C, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*. Nessa análise, a associação entre rs116799036 e DB se manteve significativa independentemente do *HLA-B*51:01* em ambos os coortes. Além disso, a associação entre *HLA-B*51:01* e DB desapareceu, quando a análise foi controlada para o SNP rs116799036, sinalizando que a associação entre DB e *HLA-B*51* seria dependente do rs116799036 (105).

Entretanto, outro estudo de GWAS demonstrou novamente associação entre *HLA-B*51* e DB. Nesse estudo, homozigose para o gene *ERAP1*, ou seja, a variante rs17482078 que codifica p.Arg725Gln levou ao risco de se

desenvolver a DB, preferencialmente em pacientes *HLA-B*51* positivos (103). Essa interação epistática com a variante recessiva (rs17482078) da *ERAP1* na DB é semelhante às interações encontradas entre alelos do MHC-classe I (*HLA-Cw*06* e *HLA-B*27*) e *ERAP1* na psoríase e em espondiloartrites, respectivamente (106,107).

Quanto as manifestações clínicas da DB, estima-se que a presença do *HLA-B*5/B*51* aumenta em 7-13% a chance de se desenvolver úlceras genitais, envolvimento ocular e cutâneo, enquanto há uma redução da chance de envolvimento do trato digestório em 30%. Há uma associação significativa entre a presença de *HLA-B*5/B*51* e sexo masculino em pacientes com DB (108). Entretanto, a associação entre a presença de *HLA-B*5/B*51* com fenótipos específicos da DB é apenas modesta e o quadro clínico parece ser indistinguível em indivíduos que apresentam ou não o *HLA-B*5/B*51*. Todavia, estudos avaliaram apenas as manifestações da DB de forma superficial e não se pode descartar associação desse marcador com manifestações específicas da doença (p. ex. uveíte posterior) (108). A ausência de associação entre *HLA-B*5/B*51* com manifestações sabidamente associadas a um mau prognóstico na DB (p. ex. manifestações vasculares ou neurológicas) indiretamente pode indicar que esse marcador não se associa a maior mortalidade (109,110). Na população brasileira, a frequência do *HLA-B*51* é bastante variável (7,8 a 21,2%) em diferentes regiões do país. Na cidade de São Paulo, a frequência observada desse alelo foi de 19% entre 239 indivíduos da população geral (111). Quanto ao alelo *HLA-B*51:01*, foi observada uma frequência de 14,7% em indivíduos caucasianos na cidade de Belo Horizonte e de 1,7% em indígenas (112,113). Entretanto não se sabe até o momento qual a prevalência de *HLA-B*51* e de seus subtipos em pacientes brasileiros com DB e não são conhecidas associações entre a positividade do *HLA-B*51* ou de seus subtipos e o risco de se desenvolver DB em nossa população.

Evidências de associação com DB, independente do *HLA-B*51*, foram observadas em regiões do final do telômero do MHC classe I, em torno do *HLA-A* em estudos de GWAS em população turca e japonesa (98,99). Evidências de associação entre o locus A do MHC classe I e DB já haviam sido observadas em estudos que genotiparam o HLA em pacientes com DB. Na

população japonesa e coreana, foi observada associação entre o *HLA-A*26:01* e DB (114,115), o que não foi evidenciado nos coortes da Turquia e de Itália, que por sua vez, encontraram associação entre DB e o *HLA-A*02:01* (116). Por outro lado, a presença do *HLA-A*33:03* teve efeito protetor para o desenvolvimento da DB no Japão (114).

Quanto aos loci não clássicos do MHC classe I, já foram descritas associação positiva entre *HLA-F*01:01:01* e *HLA-G*01:01:02* com DB e efeito protetor para a DB do *HLA-F*01:01:02* e do *HLA-G*01:04:01* em japoneses (114). Em população coreana, observou-se efeito protetor para DB dos genes *HLA-E*01:01* e do *HLA-G*01:01:01* (117). Evidências de associações entre regiões de loci não clássicos do MHC classe I e DB foram observadas em estudos GWAS realizado em pacientes da Japão, na Turquia e na Itália (99,105). No estudo realizado por Hughes *et al*, o SNP rs114854070, localizado 1,4kb acima do *HLA-F-AS1* se associou a maior risco de DB (105).

Além das evidências de associações entre DB e SNPs de regiões do HLA, estudos de GWAS também contribuíram para o entendimento da genética e da fisiopatologia da DB, ao demonstrarem susceptibilidade genética para a doença em genes de regiões fora do HLA (97,118). Exemplos de associações fora do HLA com DB incluem o alelo A dos SNPs rs1518111 e rs1800872 do gene da interleucina (IL)-10 (*IL10*) e a região intergênica entre genes do receptor da IL-23 (*IL23R*) e o receptor β_2 da IL-12 (*IL12RB2*), com o SNP rs924080 (98,119). Outro estudo demonstrou que a associação com significância de GWAS se encontra na região do gene *IL23R* (120), ao invés do *IL12RB2*, inclusive com haplótipo formado por 4 SNPs, incluindo o rs17375018 do gene *IL23R* esteve fortemente associado à DB em chineses (121). A associação entre o SNP rs897200 do gene *STAT4* foi demonstrada em dois estudos de GWAS, inclusive com maior atividade de transcrição, o que pode implicar em maior produção de IL-17 (101,103). Também foram descritas na DB, associações com significância de GWAS de SNPs dos genes *CCR1* (rs7616215), *KLRC4* (rs2617170), *GIMAP2/GIMAP4* e *UBAC2* (100,102,103).

2. JUSTIFICATIVA

2- JUSTIFICATIVA

Apesar da frequência do *HLA-B*51* e de alguns de seus subtipos ser conhecida na população brasileira, não há estudos que tenham avaliado a prevalência desse gene e de seus subtipos em indivíduos brasileiros com DB e nem possíveis associações clínicas entre manifestações específicas da DB e o *HLA-B*51*.

3. HIPÓTESES

3- HIPÓTESES

Pacientes brasileiros com DB, residentes no estado de São Paulo, apresentam frequência de *HLA-B*51* significativamente superior a indivíduos saudáveis pareados para sexo. Em pacientes brasileiros com DB, a presença do *HLA-B*51* se associa a manifestações de maior gravidade da doença, como manifestações oculares, neurológicas e/ou vasculares.

4. OBJETIVOS

4- OBJETIVOS

- **Primário:**
 - Avaliar a frequência de gene *HLA-B*51* em pacientes brasileiros com DB e comparar a controles saudáveis.
- **Secundários:**
 - Avaliar se há associação entre a presença dos subtipos *HLA-B*51:01* e *HLA-B*51:08* e maior risco de DB na população brasileira;
 - Avaliar se há associação negativa entre a presença do subtipo *HLA-B*51:07* e DB em indivíduos brasileiros;
 - Avaliar associação entre a presença do *HLA-B*51* e seus subtipos com manifestações clínicas específicas da DB.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5- PACIENTES E MÉTODOS

5.1- Pacientes e controles:

Foi realizado um estudo transversal que incluiu 83 pacientes com diagnóstico de DB em seguimento regular no Ambulatório de Vasculites da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) e 258 controles saudáveis. Os critérios de inclusão no grupo de pacientes são os seguintes: idade acima de 18 anos, cumprimento dos critérios diagnósticos do Grupo Internacional de Estudos na DB (ISG) (57) e/ou do Critério Internacional para DB (ICBD) (58) e consentimento em participar do estudo. No grupo controle, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: idade superior a 45 anos, ausência de manifestações de doenças autoimunes, consentimento em participar do estudo e ausência de manifestações clínicas da DB. Indivíduos do grupo controle foram convidados a participar do estudo entre os doadores saudáveis do Banco de Sangue do Hospital São Paulo/UNIFESP-EPM, funcionários do Hospital São Paulo/UNIFESP-EPM, acompanhantes não consanguíneos de pacientes seguidos nos diferentes ambulatórios da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP-EPM e indivíduos submetidos à coleta de sangue no Laboratório Central do Hospital São Paulo, que não apresentaram manifestações de doenças autoimunes ou manifestações clínicas da DB.

O cálculo do número amostral (n) do estudo foi realizado com assistência do estatístico Valdecir Marvulle, utilizando a fórmula abaixo. Foi levado em consideração o desfecho primário como uma proporção, em população finita para o grupo de pacientes:

$$n = \frac{N}{(N - 1) * \varepsilon_0^2 + 1}$$

Onde: n = tamanho da amostra

N = tamanho total da população de pacientes

ε_0 = erro tolerável

Considerando o número total aproximado de pacientes com DB seguidos em nosso ambulatório era de 100 ($N = 100$) à época do planejamento do estudo e $\varepsilon_0 = 0,05$ (5%), seria necessário o tamanho da amostra de 80 pacientes com DB ($n = 80$). Se o número total de pacientes com DB seguidos em nosso ambulatório fosse de 200 ($N = 200$), com o mesmo ε_0 , precisaríamos de uma amostra com 134 pacientes. Em relação ao grupo controle, considerando-o como uma população infinita e levando-se em conta a prevalência do alelo *HLA-B*51* de 19% na cidade de São Paulo (113), seriam necessários 290 controles saudáveis.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM (Processo nº 719.765-14) e todos os participantes do estudo assinam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos 1 e 2). Após assinatura do TCLE, os pacientes com DB foram submetidos à avaliação clínica quanto aos dados demográficos e às manifestações clínicas da doença, enquanto foram informações sobre dados demográficos em indivíduos do grupo controle. Os dados demográficos contemplaram idade ao estudo, gênero, cor da pele de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (122) e naturalidade. As informações quanto às manifestações clínicas incluíram (Anexo 3): úlceras orais, úlceras genitais, lesões cutâneas (eritema nodoso-símile, lesões acneiformes e pápulo-pustulosas), artralgias/artrite, envolvimento ocular (uveíte anterior, uveíte posterior, pan-uveíte ou vasculite retiniana), envolvimento do trato gastrointestinal (ulcerações com ou sem perfuração em qualquer seguimento, especialmente na região íleo-cecal), neurológico (meningo-encefalite, meningite asséptica isolada, trombose venosa cerebral, pseudotumor cerebral), vascular (tromboflebite superficial, trombose venosa profunda e aneurismas arteriais) e positividade do teste da patergia (Anexo 3). Pacientes com DB foram agrupados de acordo com a gravidade das manifestações da DB em: doença leve a moderada (envolvimento mucocutâneo, artralgias/artrite e uveíte anterior) e doença grave (uveíte posterior, vasculite retiniana, neurite óptica envolvimento neurológico, do trato digestório ou vascular) de acordo com os critérios estabelecidos por Krause (123,124).

5.2- Identificação do *HLA-B*51*

5.2.1- Isolamento do DNA

O DNA de indivíduos do grupo controle e de pacientes com diagnóstico de DB foi extraído a partir do sangue periférico com kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen™, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Foi obtido de cada participante do estudo um volume de 5mL de sangue periférico, coletado em tubo com EDTA. O isolamento do DNA a partir de sangue total foi feito pela técnica de extração por colunas de sílica.

O procedimento de isolamento do DNA foi baseado na bula do fabricante do kit de extração. Resumidamente, foram colocados 200µL de sangue total em microtubo estéril e foram adicionados 20µL de proteinase K, seguido por 20 µL de RNase A. Após misturar o conteúdo do microtubo, utilizando o vórtex brevemente, foi realizada incubação à temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200µL de *PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer* ao microtubo e o conteúdo foi misturado novamente utilizando-se o vórtex. Amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura de 55°C e foram acrescentados 200µL de etanol 96-100% ao lisado, que foi levado ao vórtex para agitação e mistura por 5 segundos, até se obter uma mistura homogênea. A próxima etapa, de ligação do DNA, consistiu em adicionar aproximadamente 640µL do lisado à coluna, com posterior centrifugação a 10.000g por 1 minuto em temperatura ambiente. O microtubo utilizado foi, então, descartado, sendo conectado um novo microtubo à coluna para a etapa de lavagem do DNA. Nessa etapa, foram acrescentados 500µL da solução de lavagem 1 à coluna, sendo realizada nova centrifugação a 10.000g por 1 minuto. O microtubo foi novamente substituído e foram adicionados 500µL da solução de lavagem 2, seguidos por nova centrifugação em velocidade máxima por 3 minutos. Depois, o tubo utilizado foi trocado por um microtubo estéril de 1,5ml, onde foram adicionados 40µL de *Pure Link Genomic Elution Buffer* à coluna para eluição do DNA. O produto foi incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e novamente centrifugado em velocidade máxima por 1 minuto.

As amostras de DNA assim obtidas foram quantificadas por

espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a 260nm, e sua pureza foi aferida pela razão 260/280nm. O tubo contendo DNA foi armazenado a -18°C até a realização de experimentos adicionais.

5.2.2 Amplificação por PCR da região polimórfica para posterior sequenciamento

Para investigação do gene *HLA-B*51*, a metodologia empregada foi a PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primer*) utilizando iniciadores específicos, seguindo metodologia comercial com o kit *Ambisolv™ Primer Mixes* (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Foram selecionados dois conjuntos de iniciadores que abrangem os alelos *B*51-01* e *B*51-24*. A região amplificada compreende dois fragmentos: um contendo 311 e outro 116 pares de base (bp), cada um deles específico para determinação de um dos alelos, conforme Quadro 4.

Quadro 4 – Primers utilizados na reação de PCR para amplificação do trecho de interesse *B*51-01A* e *B*51-24*^a.

Primer	Especificidade do alelo	Sense Primer	Localização do sense primer	Antisense Primer	Localização do antisense primer	Tamanho do produto da PCR
<i>B51-01A</i>	B*1807, B*3521/24, B*510101-0107/03-04/06/08-09/11N-14/16-21/24-33/35/37-39/41N/43-46, B*5302/06, B*7801-0202	CTT	272	CAC	583	590
<i>B51-24A</i>	B*510101-0103/0105-09/11N-12/1302-14/16-23/26-41N/43-44N/46, B*520101-10, B*5808	TCC	319	AGA	435	395

A – adenina; C – citosina, G – guanina; T – timina.

Foram feitas duas misturas de reação (uma mistura de reação para cada *primer*). Para cada 10 amostras de DNA, a mistura continha: 25µL de água ultrapura, 15µL do tampão do kit, 25µL de cada *primer* (sense e antisense) e 1µL de Taq DNA Polimerase 1kb. A mistura foi então distribuída nos tubos de PCR, para cada tubo foram adicionados 1µL de DNA (75 a 125ng) e os tubos foram levados ao termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) para amplificação da sequência de interesse. O controle

negativo da reação consistiu de um tubo com a mistura e água ultrapura sem DNA extraído. O protocolo utilizado foi adaptado a partir das recomendações do fabricante.

A ciclagem da PCR é descrita no Quadro 5, conforme instruções do fabricante. Após o término da reação os tubos foram rapidamente centrifugados e o produto de PCR foi analisado em gel de agarose.

Quadro 5 – Protocolo de ciclagem utilizado para a PCR.

Passos	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Ação
Desnaturação	96	60	Denaturação
	96	25	Denaturação
5 ciclos	70	50	Anelamento
	72	45	Extensão
	96	25	Denaturação
21 ciclos	75	50	Anelamento
	62	45	Extensão
	96	25	Denaturação
4 ciclos	55	60	Anelamento
	72	120	Extensão
Manter	4	Tempo inespecífico	—

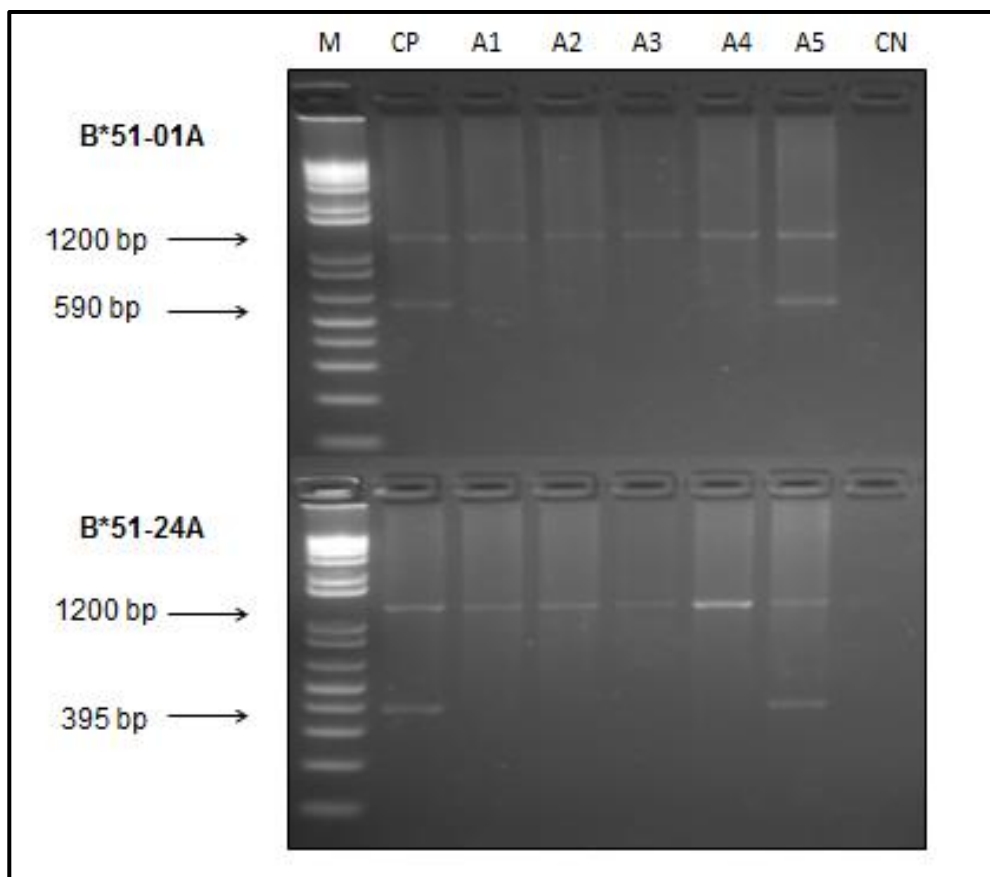
5.2.3- Gel de agarose a 2% para análise dos produtos de PCR

Para visualização das bandas de 590 e 395bp, os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose a 2%, em cuba de eletroforese horizontal. O gel foi preparado com agarose a 2% em tampão 0,5X TBE (Tris Borato EDTA), corado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos) 8µl a cada 100ml de solução de agarose. Foram aplicados 7,7µl do volume total da reação de PCR das diferentes amostras. Como padrão de massa molecular, foi utilizado 5µl de *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, Estados Unidos) por corrida.

Cada corrida eletroforética foi realizada com 5 amostras e a imagem de cada gel foi adquirida no Fotodocumentador Lumi-Bis (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel). A Figura 1 ilustra o resultado obtido na

amplificação no gel de agarose a 2%.

Figura 1 – Imagem dos produtos da reação de PCR após separação eletroforética em gel de agarose a 2%.



A presença das bandas de 590bp (para *primer* B51-01A) e 395pb (para *primer* B51-04A) mostra a amplificação do trecho de interesse. M = marcador de 1Kb (Invitrogen by Life Technologies); A1 a A6 = amostras de participantes do estudo; CN = controle negativo da reação; CP= controle positivo.

5.2.4- Sequenciamento genético do *HLA-B*51*

Amostras de indivíduos do grupo controle e de pacientes com DB positivas para *HLA-B*51* foram então submetidas à reação de sequenciamento por kit *SeCore® Sequencing* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para identificar seus subtipos. O sequenciamento genético identifica diretamente a sequência de DNA, a partir de um gene HLA marcado. A amplificação de um *locus* específico do HLA foi efetuada através da ciclagem de uma mistura de amplificação, com a enzima *FastStart™ TAQ* polimerase

(Sigma-Aldrich, San Louis, MO, Estados Unidos) e uma amostra de DNA genômica. O produto final foi tratado com ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, Estados Unidos), antes do sequenciamento, para degradar os *primers* não incorporados e os nucleotídeos livres. A sequência nucleotídica e o subtipo do HLA resultante foram determinados pelo sequenciamento multicolor baseado em fluorescência com o kit BigDye® Terminator v1.1 Matrix Standard (Dye Set E) 3100,3130 e 3500 Genetic Analyzers (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). As reações finais foram purificadas através precipitação do etanol antes do processamento. Amostras serão carregadas com formamida desnaturada e os resultados detectados a partir do Software HLA SBT uTYPE 7.0 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

5.3- Análise estatística

Para realizar a análise estatística do estudo, utilizamos o programa *IBM SPSS Statistics* versão 20.0 para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, Estados Unidos) e gráficos foram criados com o programa GraphPad Prism para Windows versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos). Variáveis numéricas são apresentadas sob a forma de média e desvio padrão ou de mediana e intervalo interquartil de acordo com a distribuição. Variáveis categóricas são apresentadas sob a forma de número total e percentagem. Comparações entre variáveis numéricas são realizadas com o teste *t* de Student ou pelo test U de Mann-Whitney, enquanto para variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui quadrado com estimativa de risco para desenvolvimento de DB na presença de *HLA-B*51* e de seus subtipos mais relevantes. Realizamos regressão logística univariada para investigar associação entre *HLA-B*51* e subtipos com DB. Posteriormente, foram feitos diferentes modelos de análise multivariada com regressão logística para investigar associações entre *HLA-B*51* e seus subtipos com DB e com manifestações da DB. Resultados das análises de regressão logística foram expressos em razão de chances [*Odds ratio* (OR)] e intervalo de confiança de 95% (IC95%). O nível de significância aceito foi de 5% ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS

6- RESULTADOS

6.1- Dados demográficos

Foram avaliados 83 pacientes com DB e 258 controles saudáveis, não houve diferenças entre os grupos em relação ao gênero, cor e à região de naturalidade, porém a mediana de idade do grupo controle foi superior à dos pacientes. Os dados demográficos dos participantes do estudo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos dos pacientes e controles incluídos no estudo.

Aspectos Demográficos	Doença de Behçet (n = 83)	Grupo Controle (n = 258)	p
Idade, anos	41,0 (33,0-53,0)	55,0 (43,0-65,3)	<0,0001
Sexo Feminino, n (%)	46 (55,4)	159 (61,6)	0,315
<i>Cor da pele</i>			
Pretos, n (%)	10 (12,0)	34 (13,2)	0,125
Pardos, n (%)	49 (59,0)	118 (45,7)	
Brancos, n (%)	24 (28,9)	101 (39,1)	
Amarelos, n (%)	0 (0,0)	5 (1,9)	
<i>Região de Naturalidade</i>			
Sudeste, n (%)	54 (65,1)	174 (67,4)	0,494
Nordeste, n (%)	27 (32,5)	69 (26,7)	
Sul, n (%)	1 (1,2)	8 (3,1)	
Norte, n (%)	1 (1,2)	2 (0,8)	

n- número da amostra; resultados em negrito com significância estatística.

6.2- Manifestações clínicas da doença de Behçet

A maioria dos pacientes avaliados no estudo apresentou manifestações mucocutâneas da DB, mas também foi observada alta frequência de manifestações oculares (Tabela 2). Entre os 83 pacientes avaliados no estudo, 10 (12,04%) pacientes preencheram apenas os critérios de diagnóstico do ICBD, enquanto a grande maioria cumpriu os critérios diagnósticos tanto do ICBD quanto do ISG para DB. A grande maioria dos pacientes (73%) apresenta manifestações graves da DB, segundo os critérios de Krause (125).

Tabela 2 – Frequência das manifestações clínicas dos pacientes com DB avaliados no estudo.

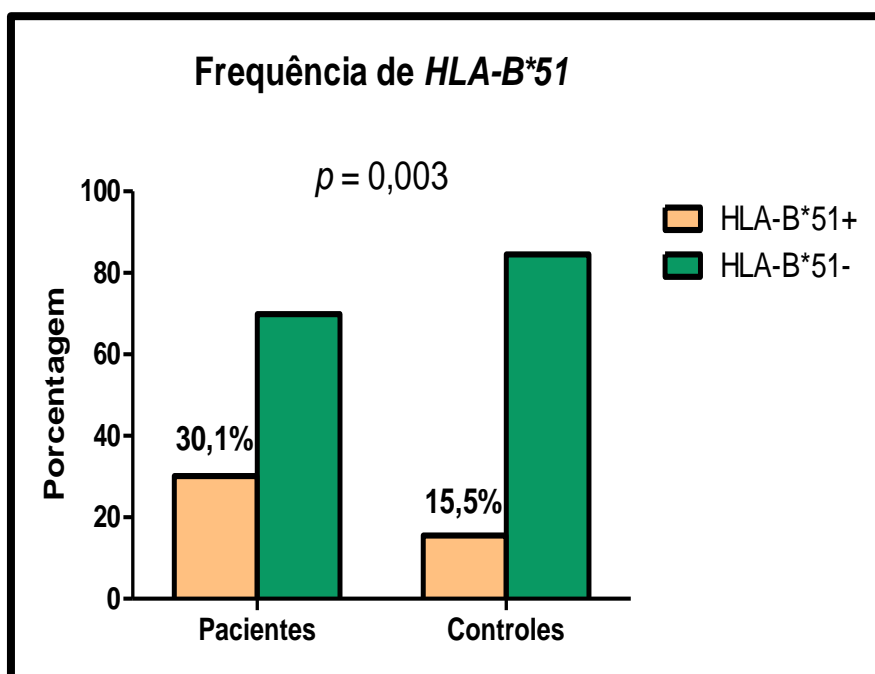
Aspectos Clínicos	Resultados (n = 83)
Tempo desde o diagnóstico, meses	96,0 (48,0-168,0)
Úlceras orais, n (%)	83 (100,0)
Úlceras genitais, n (%)	67 (80,7)
Envolvimento cutâneo, n (%)	61 (73,5)
Envolvimento articular, n (%)	30 (36,1)
Envolvimento ocular, n (%)	55 (66,3)
Manifestações oculares recorrentes, n (%)	28 (33,7)
Envolvimento vascular, n (%)	15 (18,1)
Manifestações vasculares recorrentes, n (%)	3 (3,6)
Envolvimento Neurológico, n (%)	19 (22,9)
Manifestações neurológicas recorrentes, n (%)	7 (8,4)
Envolvimento do trato gastrointestinal, n (%)	4 (4,8)
Teste da patergia positivo*, n (%)	11 (24,4)
Preenchem os critérios do ISG, n (%)	73 (88,0)

* Porcentagem da patergia baseada em 45 casos; n – número de pacientes; ISG – *International Study Group*.

6.3- Presença do *HLA-B*51* e seus subtipos em pacientes com doença de Behçet e em controles saudáveis.

Foi observada frequência significativamente maior de *HLA-B*51* em pacientes com DB em comparação a controle saudáveis (30,1% vs. 15,5%; $p = 0,003$) (Figura 2) e a presença de *HLA-B*51* foi fator de risco para se desenvolver DB (OR = 2,349; IC95: 1,319-4,185).

Figura 2 – Comparação entre pacientes e controles quanto à presença do *HLA-B*51*.



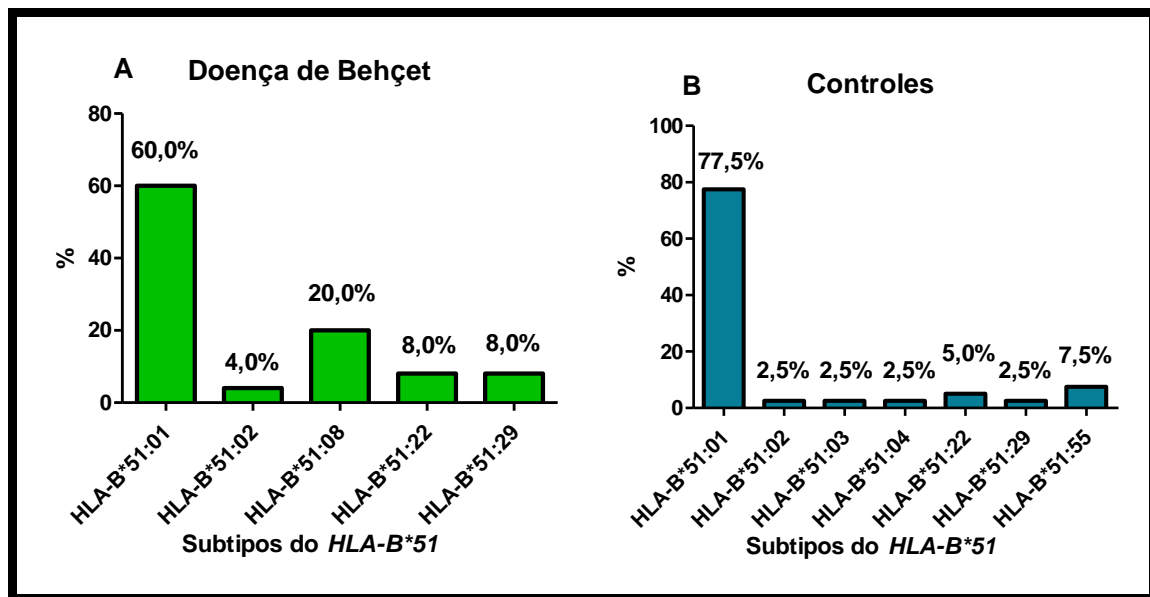
Entretanto, essa associação não foi observada para o subtipo *HLA-B*51:01* (OR= 1.615; IC95: 0,824–3,167) ou para o subtipo *HLA-B*51:08* (nenhum indivíduo do grupo controle apresentava este alelo) com o risco de desenvolver DB.

6.3.1 Subtipos do *HLA-B*51* em pacientes com doença de Behçet e em controles saudáveis.

O subtipo mais prevalente do *HLA-B*51*, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes, foi o *HLA-B*51:01*. Outros subtipos aparecem em

ambos os grupos, como o *HLA-B*51:29* e o *HLA-B*51:22*. Mas, o *HLA-B*51:08* foi encontrado somente entre os pacientes com DB (Figura 3).

Figura 3 – Frequência dos subtipos do *HLA-B*51* nos pacientes com doença de Behçet e no grupo controle.



Porcentagem de cada subtipo do *HLA-B*51* calculada em relação ao número de participantes positivos para o *HLA-B*51*.

6.4- Associações entre *HLA-B*51* e dados demográficos e manifestações clínicas em pacientes com doença de Behçet.

Entre os pacientes com DB, não houve diferenças significantes quanto à cor da pele, gênero masculino e região de naturalidade no país, em relação à presença do *HLA-B*51* (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre as características demográficas em pacientes com doença de Behçet e a presença do *HLA-B*51*.

Variáveis	HLA-B*51 presente (n= 25)	HLA-B*51 ausente (n= 58)	p
Cor da pele			
Branca, n (%)	10 (40,0)	14 (24,1)	0,144
Não branca, n (%)	15 (60,0)	44 (75,9)	
Gênero			
Feminino, n (%)	14 (56,0)	32 (55,0)	0,945
Masculino, n (%)	11 (44,0)	26 (44,8)	
Região de naturalidade			
Sudeste, n (%)	14 (56,0)	40 (68,9)	0,174
Nordeste, n (%)	11 (44,0)	16 (27,6)	

n - número de pacientes.

A frequência de *HLA-B*51* foi significativamente menor em pacientes com histórico de manifestações neurológicas e houve uma tendência a maior frequência de envolvimento ocular e menor frequência de úlceras genitais em pacientes com DB que apresentavam *HLA-B*51*, quando comparados àqueles pacientes com ausência desse alelo. Todavia, a frequência de pacientes com recidivas de manifestações oculares (40% vs. 31%; $p = 0,428$) e de pacientes com recidivas de manifestações neurológicas (8,0% vs. 8,6% $p = 0,926$) foi semelhante entre pacientes com e sem *HLA-B*51*. Demais manifestações clínicas da doença não apresentaram associação com *HLA-B*51* (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação entre manifestações clínicas da doença de Behçet e *HLA-B*51*.

Manifestações clínicas	<i>HLA-B*51</i> presente (n= 25)	<i>HLA-B*51</i> ausente (n= 58)	<i>p</i>
Úlceras genitais, n (%)	23 (92,0)	44 (75,9)	0,087
Envolvimento cutâneo, n (%)	21 (84,0)	40 (69,0)	0,155
Envolvimento articular, n (%)	11 (44,0)	19 (32,8)	0,328
Envolvimento ocular, n (%)	20 (80,0)	35 (60,3)	0,082
Envolvimento vascular, n (%)	3 (12,0)	12 (20,7)	0,345
Envolvimento neurológico, n (%)	2 (8,0)	17 (29,3)	0,034
Envolvimento do trato gastrointestinal, n (%)	2 (8,0)	2 (3,4)	0,374
Teste da patergia positivo*, n (%)	3 (23,1)	8 (25,0)	0,892
Preenchem critérios do ISG, n (%)	24 (96,0)	49 (84,5)	0,139
Manifestações graves, n (%)	22 (88,0)	51 (87,9)	0,993

*Porcentagem da patergia baseada em 45 casos; resultados em negrito com significância estatística; ISG – *International Study Group*; n – número de pacientes.

6.4.1- Dados demográficos e manifestações clínicas em pacientes com doença de Behçet e o subtipo *HLA-B*51:01*.

Entre os pacientes com DB, não houve diferenças significativas quanto à cor da pele, região de naturalidade e gênero em relação à presença de *HLA-B*51:01* (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre as características demográficas em pacientes com doença de Behçet e *HLA-B*51:01*.

Variáveis	HLA-B*51:01	HLA-B*51:01	p
	presente (n= 15)	ausente (n=68)	
Cor da pele			
Branca, n (%)	7 (46,7)	17 (25,0)	0,119
Não branca, n (%)	8 (53,3)	51 (75,0)	
Gênero			
Feminino, n (%)	8 (53,3)	38 (55,9)	0,857
Masculino, n (%)	7 (46,7)	30 (44,1)	
Região de naturalidade			
Sudeste, n (%)	9 (60,0)	45 (66,2)	0,843
Nordeste, n (%)	6 (40,0)	21 (30,9)	

n - número de pacientes.

Maior frequência de envolvimento ocular foi observada em pacientes com DB que apresentavam *HLA-B*51:01* e esse alelo estava ausente em pacientes com DB que apresentaram manifestações neurológicas ou vasculares. Demais manifestações clínicas da DB não tiveram associação com *HLA-B*51:01* (Tabela 6). Houve tendência à maior frequência de pacientes com DB que apresentaram alguma recorrência de manifestações oculares, entre aqueles com *HLA-B*51:01*, em comparação àqueles que não apresentavam esse alelo (53,3% vs. 29,4%; $p = 0,076$). Porém, não foram observadas recorrências de manifestações vasculares ou neurológicas entre pacientes com DB que apresentaram *HLA-B*51:01*.

Tabela 6 – Manifestações clínicas da doença de Behçet e *HLA-B*51:01*.

Manifestações clínicas	<i>HLA-B*51:01</i>	<i>HLA-B*51:01</i>	<i>p</i>
	presente (n= 15)	ausente (n= 68)	
Úlceras genitais, n (%)	14 (93,3)	53 (77,9)	0,171
Envolvimento cutâneo, n (%)	12 (80,0)	49 (72,1)	0,528
Envolvimento articular, n (%)	8 (53,3)	22 (32,4)	0,126
Envolvimento ocular, n (%)	14 (93,3)	41 (60,3)	0,014
Envolvimento vascular, n (%)	0 (0,0)	15 (22,1)	0,044
Envolvimento neurológico, n (%)	0 (0,0)	19 (27,9)	0,020
Envolvimento do trato gastrointestinal, n (%)	1 (6,7)	3 (4,4)	0,712
Teste da patergia positivo*, n (%)	1 (10,0)	10 (28,6)	0,567
Preenchem critérios do ISG, n (%)	15 (100,0)	58 (85,3)	0,113
Manifestações graves, n (%)	14 (93,3)	59 (86,8)	0,479

*Porcentagem da patergia baseada em 45 casos; resultados em negrito com significância estatística; ISG – *International Study Group*; n – número de pacientes.

6.4.2- Dados demográficos e manifestações clínicas em pacientes com doença de Behçet e a presença de *HLA-B*51:08*.

Entre os pacientes com DB, não houve diferenças significativas quanto à cor da pele, região de naturalidade e gênero em relação à presença ou ausência de *HLA-B*51:08* (Tabela 7).

Tabela 7 – Características demográficas em pacientes com doença de Behçet e *HLA-B*51:08*.

Variáveis	HLA-B*51:08	HLA-B*51:08	p
	presente (n = 5)	ausente (n = 78)	
Cor da pele			
Branca, n (%)	1 (20,0)	23 (29,5)	0,650
Não Branca, n (%)	4 (80,0)	55 (70,5)	
Gênero			
Feminino, n (%)	2 (40,0)	44 (56,4)	0,474
Masculino, n (%)	3 (60,0)	34 (43,6)	
Região de naturalidade			
Sudeste, n (%)	3 (60,0)	51 (67,1)	0,744
Nordeste, n (%)	2 (40,0)	25 (32,9)	

n - número de pacientes.

A frequência de *HLA-B*51:08* foi significativamente maior em pacientes com DB que apresentavam envolvimento vascular e naqueles pacientes com recorrências de tais manifestações (20,0% vs. 2,6%; $p = 0,043$). Demais manifestações clínicas da doença não apresentaram associações significantes com a presença de *HLA-B*51:08* (Tabela 8).

Tabela 8 – Manifestações clínicas da doença de Behçet e *HLA-B*51:08*.

Manifestações clínicas	<i>HLA-B*51:08</i>	<i>HLA-B*51:08</i>	<i>p</i>
	presente (n= 5)	ausente (n= 78)	
Úlceras genitais, n (%)	4 (80,0)	63 (80,8)	0,966
Envolvimento cutâneo, n (%)	4 (80,0)	57 (73,1,0)	0,734
Envolvimento articular, n (%)	1 (20,0)	29 (37,2)	0,438
Envolvimento ocular, n (%)	3 (60,0)	52 (66,7)	0,760
Envolvimento vascular, n (%)	3 (60,0)	12 (15,4)	0,012
Envolvimento neurológico, n (%)	0 (0,0)	19 (24,4)	0,209
Envolvimento do trato gastrointestinal, n (%)	1 (20,0)	3 (3,8)	0,102
Teste da patergia positivo*, n (%)	0 (0,0)	11 (25,0)	0,567
Preenchem critérios do ISG, n (%)	4 (80,0)	69 (88,5)	0,573
Manifestações graves, n (%)	4 (80,0)	69 (88,5)	0,573

*Porcentagem da patergia baseada em 45 casos; resultados em negrito com significância estatística; ISG – *International Study Group*; n – número de pacientes.

6.5- Análises de regressão logística uni e multivariadas

Foram realizadas análises uni e multivariadas para definir associações de risco do gene *HLA-B*51* e subtipos *HLA-B*51:01* e *HLA-B*51:08* com DB e manifestações clínicas específicas como manifestações oculares, neurológicas e vasculares, utilizando também dados demográficos e outras manifestações clínicas como variáveis independentes.

6.5.1- Análises de regressão logística uni e multivariadas com *HLA-B*51*

Na análise univariada, foram utilizados os dados demográficos e a presença do alelo *HLA-B*51* como variáveis independentes e a DB como variável dependente. A presença do alelo *HLA-B*51* se mostrou fator de risco para o desenvolvimento da DB, de forma independente da cor não branca, sexo feminino e naturalidade na Região Sudeste, conforme expostos na Tabela 9.

Na análise univariada, foram utilizados os dados demográficos e a presença do alelo *HLA-B*51* como variáveis independentes e a DB como variável dependente. A presença de *HLA-B*51* se mostrou fator de risco para o desenvolvimento da DB, de forma independente da cor da pele, do gênero e da naturalidade na Região Sudeste, conforme expostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Análise univariada e multivariada para associações entre variáveis demográficas, presença de *HLA-B*51* e doença de Behçet.

Variáveis	OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	IC95
	<i>Análise univariada</i>		<i>Análise multivariada</i>		
Gênero feminino	0,774	0,316	0,707	0,194	0,419 – 1,193
Cor Branca	1,581	0,094	1,545	0,130	0,880 – 2,711
Procedência - Sudeste	0,793	0,400	0,872	0,635	0,495 – 1,536
<i>HLA-B*51</i>	2,349	0,004	2,410	0,004	1,332 – 4,361

IC95 – Intervalo de confiança de 95%; OR – Odds ratio; resultados em negrito com significância estatística.

Em relação à presença do alelo *HLA-B*51* e suas associações com manifestações clínicas da DB, a análise univariada mostrou que a presença do alelo foi fator de proteção para o desenvolvimento do quadro neurológico da DB (OR: 0,210; IC95%: 0,444–0,990; *p* = 0,048). Porém, essa associação não foi independente na análise multivariada. De fato, a naturalidade na região Sudeste e o envolvimento ocular, se mostraram protetores, de forma independente, para o quadro neurológico da DB, mas não o *HLA-B*51* (Tabela 10).

Tabela 10 – Análise multivariada para avaliar o risco de se desenvolver manifestações neurológicas entre os pacientes com doença de Behçet.

Variáveis	OR	IC95	p
Gênero feminino	2,200	0,310 - 15.606	0,430
Cor Branca	0,418	0,066 – 2,642	0,354
Procedência - Sudeste	0,055	0,008 – 0,394	0,004
Úlceras genitais	0,536	0,044 – 6,546	0,625
Envolvimento Cutâneo	3,496	0,514 – 23,804	0,201
Envolvimento Articular	1,181	0,265 – 5,273	0,827
Envolvimento Ocular	0,053	0,009 – 0,313	0,001
Envolvimento Vascular	1,055	0,147 – 7,561	0,958
<i>HLA-B*51</i>	0,119	0,014 – 1,036	0,054

IC95 – Intervalo de confiança de 95%; OR – Odds ratio; resultados em negrito com significância estatística.

6.5.2- Análises de regressão logística uni e multivariadas com *HLA-B*51:01*.

Na análise univariada, utilizando os dados demográficos e a presença do alelo *HLA-B*51:01* como variáveis independentes e a DB como variável dependente, a presença do alelo *HLA-B*51:01* não se mostrou fator de risco para o desenvolvimento (OR: 1,615; IC95: 0,824 - 3,167; $p = 0,163$).

Em relação à presença do alelo *HLA-B*51:01* e suas associações com manifestações clínicas da DB, a análise univariada demonstrou que a presença desse subtipo do *HLA-B*51* foi fator de risco para o desenvolvimento do quadro ocular da DB (OR: 9,220; IC95: 1,145–74,249; $p = 0,037$). Porém, essa associação não confirmada na análise multivariada (Tabela 11). De fato, o envolvimento neurológico se mostrou protetor de forma independente para o quadro ocular da DB, mas não o alelo *HLA-B*51:01*.

As análises uni e multivariada considerando as manifestações neurológicas e vasculares, e sua possível associação com o *HLA-B*51:01*, não puderam ser realizadas, pois nenhum paciente com o envolvimento de tais sistemas apresentou esse subtipo do *HLA-B*51*.

Tabela 11 – Análise multivariada para o risco de desenvolver manifestações oculares entre os pacientes com doença de Behçet.

Variáveis	OR	IC95	p
Gênero feminino	0,859	0,249 - 2,971	0,811
Cor Branca	0,829	0,215 – 3,200	0,786
Procedência – Sudeste	0,212	0,041 – 1,094	0,064
Úlceras genitais	0,160	0,023 – 1,091	0,061
Envolvimento Cutâneo	2,248	0,590 – 8,568	0,235
Envolvimento Articular	0,296	0,372 – 4,517	0,685
Envolvimento Neurológico	0,068	0,012 – 0,392	0,003
Envolvimento Vascular	2,192	0,452 - 10.640	0,330
<i>HLA-B*51-01</i>	6,231	0,673 - 57,649	0,107

IC95 – Intervalo de confiança de 95%; OR – Odds ratio; resultados em negrito com significância estatística.

6.5.3- Análises de regressão logística uni e multivariadas com *HLA-B*51:08*.

Não foi possível avaliar associações entre a presença de *HLA-B*51:08* e DB, uma vez que não foi encontrado esse subtipo do *HLA-B*51* em indivíduos do grupo controle. Entre pacientes com DB, a análise univariada demonstrou que o *HLA-B*51-08* é fator de risco para o desenvolvimento de manifestações vasculares da DB (OR: 8,250; IC95: 1,244–54,717; $p = 0,029$) e essa associação foi confirmada na análise multivariada, sendo o *HLA-B*51:08* um fator de risco independente para manifestações vasculares em pacientes com DB (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise multivariada para o risco de desenvolver manifestações vasculares entre os pacientes com doença de Behçet.

Variáveis	OR	IC95	p
Gênero feminino	0,759	0,159 – 3,627	0,730
Cor Branca	2,539	0,365 – 17,660	0,346
Procedência – Sudeste	3,555	0,602 – 20,991	0,162
Úlceras genitais	0,413	0,067 – 2,525	0,338
Envolvimento Cutâneo	1,293	0,251 – 6,6671	0,338
Envolvimento Articular	0,747	0,157 – 3,558	0,714
Envolvimento Ocular	2,339	0,377 – 14,524	0,362
Envolvimento Neurológico	1,956	0,230 – 16,606	0,539
HLA-B*51-08	14,843	1,550 – 142,115	0,019

IC95 – Intervalo de confiança de 95%; OR – Odds ratio; resultados em negrito com significância estatística.

7. DISCUSSÃO

7- DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo que avaliou a prevalência do *HLA-B*51* e seus alelos em pacientes brasileiros com DB. O *HLA-B*51* foi significativamente mais frequente em pacientes com DB em comparação a controles (30,1% vs. 15,5%) e o *HLA-B*51* foi fator de risco independente para o desenvolvimento da DB, o que não foi demonstrado para o subtipo *HLA-B*51:01*. Entre pacientes com DB, o *HLA-B*51* foi menos frequente entre indivíduos com neuroBehçet, o subtipo *HLA-B*51:01* foi mais encontrado em pacientes com manifestações oftalmológicas e o *HLA-B*51:08* foi mais frequente naqueles pacientes com manifestações vasculares da DB. Entretanto, na análise multivariada, apenas o *HLA-B*51:08* esteve associado de forma independente às manifestações vasculares da doença.

Esse estudo é relevante para nosso meio, pois a DB é a vasculite sistêmica mais frequente na região Sudeste do Brasil, segundo dados de estudo epidemiológico realizado em 6 centros especializados em vasculites sistêmicas, no qual incluiu 1.233 pacientes com vasculites sistêmicas. A DB foi diagnosticada em 35% dos pacientes (66).

Dados sobre a prevalência do gene *HLA-B*51* são conhecidos em diversas regiões ao redor do mundo. Uma revisão da literatura realizada em 2011 (81), mostrou que a frequência de *HLA-B*51* em pacientes de países como Espanha e Alemanha (6,125), é similar à frequência do *HLA-B*51* observada em nosso estudo. Contudo, em países como Turquia, Israel, Japão, Itália, Coréia, Egito e Arábia Saudita (19,20,38,63,126–128), a prevalência de *HLA-B*51* é muito superior à observada em nosso estudo, variando de 50 a 70% em pacientes com DB, chegando a alcançar até 80% entre pacientes com DB em Israel (127). Na Europa, em países como Grã-Bretanha Suíça e Suécia, além dos Estados Unidos, a frequência de *HLA-B*51* é menor em pacientes com DB em relação à descrita em nosso estudo, variando de 13 a 18% (129–133).

O risco para desenvolvimento de DB em nossa população de pacientes e controles da cidade de São Paulo foi de 2,3 vezes maior em portadores do *HLA-B*51*, na análise univariada e esse risco se manteve em 2,4 vezes na análise multivariada, considerando gênero, cor da pele e região geográfica de

região de naturalidade no Brasil. Em outros países como Arábia Saudita, Palestina, Jordânia, Grécia, Israel e Itália, a razão de chances de se desenvolver DB em portador de *HLA-B*51* foi bem superior ao da nossa população, variando de 10,9 a 18,2 vezes (86,91,92,134,135). A razão de chances descrita em nosso meio, para se desenvolver a DB, é semelhante à observada entre os portadores de *HLA-B*51* do Marrocos e de Portugal (136,137), porém inferior ao risco de 5,78 vezes de se desenvolver a doença em análise realizada com *pool* de 78 estudos que avaliaram os alelos *HLA-B*5/B*51* em meta-análise (81).

Pacientes com DB e controles não apresentaram diferenças quanto à frequência de gênero feminino, cor da pele e região de nascimento, porém a mediana da idade foi propositalmente maior no grupo controle em relação ao grupo de pacientes com DB, acima da idade esperada para o diagnóstico de DB entre nossos pacientes, que é de 31,6 anos de idade (17). A inclusão de controles com idade superior em relação à dos pacientes com DB teve o objetivo de se mitigar a possibilidade de o indivíduo do grupo controle vir a desenvolver manifestações de DB, ao encontrar-se em faixa etária superior à esperada para o diagnóstico da doença.

Entre os pacientes que apresentaram o *HLA-B*51* em nosso estudo, o principal subtipo encontrado foi o *HLA-B*51:01*. Em estudos realizados em diferentes grupos étnicos, incluindo japoneses, turcos, iranianos, espanhóis, gregos, italianos e alemães (4,87,94,95,138,139) o *HLA-B*51:01* também foi o subtipo mais comum em pacientes com DB. Contudo, o *HLA-B*51:01* também foi o subtipo mais frequente do *HLA-B*51* entre indivíduos do grupo controle, de diferentes estudos. A frequência de *HLA-B*51:01* foi maior em pacientes com DB em relação a controles, em diferentes estudos realizados com grupo étnicos diversos, incluindo japoneses (58,3% vs. 13,6%) (94), turcos (87,0% vs. 81,0%) (87), iranianos (56,9% vs. 29,5%) (138), espanhóis (31,5% vs. 13,0%) (139) e gregos (80,0% vs. 26,0) (4). Em outros estudos, a frequência de *HLA-B*51:01* foi menor no grupo de pacientes com DB, em comparação ao grupo controle, como por exemplo entre italianos (73,3% vs. 100,0%) (95) e alemães (88,0% vs. 93,0%), respectivamente (87). Porém, esses estudos contavam com amostra pequena de pacientes.

Por outro lado, observamos em nosso estudo, resultados diversos foram observados quanto ao *HLA-B*51:08*, outro importante subtipo do *HLA-B*51* associado à DB, em comparação aos achados do *HLA-B*51:01*. O *HLA-B*51:08* foi detectado apenas entre pacientes com DB, mas não em indivíduos do grupo controle. Esses achados são corroborado pela literatura, pois em todos os estudos que genotiparam os subtipos do *HLA-B*51*, o *HLA-B*51:08* esteve mais fortemente associado à DB em comparação ao *HLA-B*51:01*, sendo o primeiro observado em frequência muito baixa entre indivíduos do grupo controle, enquanto o *HLA-B*51:01* é encontrado em frequência relativamente alta entre controles saudáveis (95,139).

A maior parte dos pacientes com DB incluídos nesse estudo preencheu os critérios de diagnóstico do ISG de 1990; porém, um subgrupo de pacientes com DB cumpriu apenas os critérios diagnóstico mais recentes do ICBD, que apresentam maior sensibilidade, porém menor especificidade em relação aos critérios do ISG de 1990 (57). Apesar da menor especificidade dos critérios diagnósticos do ICBD para a DB, a frequência do *HLA-B*51* não foi diferente entre pacientes com DB que cumpriam os critérios de diagnóstico do ISG em comparação àqueles que cumpriam apenas os critérios de diagnóstico do ICBD (58).

Apesar da maioria dos indivíduos com DB apresentarem manifestações clínicas mucocutâneas, observamos frequência bastante elevada de pacientes com envolvimento ocular, o que fez com que a maioria dos pacientes fosse enquadrada no grupo com manifestações graves da doença, segundo os critérios de Krause (123,124). Acreditamos que comparações entre pacientes com e sem manifestações graves da DB, em relação à presença de *HLA-B*51* e seus subtipos, tenham sido dificultadas pelo baixo número de pacientes com DB que apresentavam apenas manifestações de menor gravidade da doença, como mucocutâneas e articulares.

Em nosso estudo, entre os pacientes com DB, não houve diferenças significantes em relação ao gênero, à cor da pele e à região de naturalidade quanto à frequência de *HLA-B*51* e de seus subtipos. Essa análise se faz relevante, pois estudos prévios descreveram associação entre gênero masculino, gravidade de doença e *HLA-B*51* (108,137). Acredita-se que essa

associação entre gênero e *HLA-B*51* seja espúria e ao acaso, pois a localização dos genes do HLA no braço curto do cromossomo 6 não permite inferir herdabilidade ligada ao sexo (140). Além disso, variáveis como a cor da pele e a região geográfica de naturalidade do paciente não influenciaram a frequência de *HLA-B*51* entre nossos pacientes com DB e controles, isso aparentemente torna nossa amostra menos heterogênea. No Brasil, a origem étnica da população é complexa, com a maior parte da população caucasiana de origem portuguesa, frequentemente miscigenada com negros e eventualmente com indígenas (141). Portanto, a definição de etnia se torna muito difícil em nosso meio, mas apesar dessa complexidade em potencial, não houve diferenças geográficas de nascimento ou de cor da pele em relação à presença do *HLA-B*51*. A questão da origem étnica da população de estudo é citada com bastante relevância em estudos realizados em outros países, que têm grupos étnicos bem caracterizados, para avaliar frequência do *HLA-B*51* em pacientes com DB (78,142).

Muitos estudos avaliaram associações entre a presença do *HLA-B*51* e seus subtipos com manifestações clínicas específicas da DB (108). Portanto, tentamos analisar tais associações com manifestações clínicas da DB para o *HLA-B*51* e seus subtipos mais relevantes: *HLA-B*51:01* e *HLA-B*51:08*. Observamos uma tendência à maior frequência de manifestações genitais e oculares em pacientes com *HLA-B*51*, e frequência significativamente menor de manifestações neurológicas nos portadores desse gene. Porém, essas associações não foram confirmadas em análise multivariada. A presença de *HLA-B*51* já foi associada a diversos fenótipos da DB, destacando-se o quadro ocular, genital e cutâneo e até mesmo neurológico, mas essas associações são fracas e muitos desses achados não são confirmados por outros estudos (108), mas essas associações são fracas e muito desses achados não são confirmados por outros estudos. Em meta-análise que avaliou 72 estudos, o risco relativo e o IC95 para desenvolver manifestações clínicas específicas na presença do *HLA-B*51* foi de 1,13 (1,06-1,21) para envolvimento ocular, 1,07 (1,01-1,14) para úlceras genitais, 1,10 (1,03-1,16) para envolvimento cutâneo e 0,70 (0,52-0,94) para o quadro gastrointestinal da DB. As outras manifestações da DB não demonstraram associação significativa com o *HLA-B*51* (108).

A associação inversa entre *HLA-B*51* e manifestações neurológicas da DB, observada nesse estudo, nunca fora descrita antes. Mas em nosso estudo, ela não se manteve associada de forma independente na análise multivariada. Além disso, houve impacto da naturalidade na região Nordeste/Sudeste na frequência de manifestações neurológicas e de envolvimento ocular, as quais anularam a influência do alelo *HLA-B*51* sobre tais manifestações.

Poucos estudos avaliaram associações entre os subtipos *HLA-B*51:01* e *HLA-B*51:08* com manifestações clínicas da DB. Na análise de pacientes com DB portadores de *HLA-B*51:01*, observamos que este se associou a maior frequência de envolvimento ocular, porém esta associação não ocorreu de forma independente, na análise multivariada. No entanto, nenhum paciente com manifestações neurológicas da DB apresentou *HLA-B*51:01*, o que aparentemente indica que este alelo é fator de proteção para o desenvolvimento do quadro neurológico em pacientes com DB. Quando realizada a análise multivariada, os quadros ocular e neurológico apresentaram associação inversa entre si e independente, sem influência da presença do subtipo *HLA-B*51:01*.

Alguns estudos, realizados em grupos populacionais específicos, identificaram maior frequência do subtipo *HLA-B*51:01* na DB em turcos (143), japoneses (126), jordanianos e iranianos (96) , espanhóis (143) e gregos (4). Porém, poucos avaliaram associações entre a presença desse subtipo com manifestações clínicas específicas da doença. Destaca-se estudo realizado na Grécia (4), o qual identificou uma predisposição para o desenvolvimento de eritema nodoso em pacientes com DB, além do surgimento da doença em pacientes mais jovens e do sexo masculino, na presença de *HLA-B*51:01*.

Quando estudada a influência do *HLA-B*51:08* em relação às manifestações clínicas da DB, observamos frequência significativamente maior deste subtipo do *HLA-B*51* em pacientes com manifestações vasculares da doença e em análise multivariada, esta associação foi mantida de forma independente. Essa é a primeira evidência de associação entre *HLA-B*51:08* e alguma manifestação clínica da DB na literatura. Até o momento, esse subtipo foi associado à presença da DB entre os italianos (95), gregos (89), turcos e

alemães (87). Porém, não foram observadas associações entre este subtipo do *HLA-B*51* e manifestações clínicas específicas da DB nesses estudos.

As principais limitações desse estudo incluem seu caráter monocêntrico e número de participante relativamente pequeno para estudo que avalia HLA. Habitualmente, estudos que avaliam associações entre genes e doenças necessitam incluir grande número de pacientes com a condição em avaliação. Apesar de termos realizado cálculo do número de pacientes e controles saudáveis a serem avaliados, a população de pacientes com DB adveio de uma amostra finita de casos, o que pode ter levado a não inclusão de amostragem significativa de pacientes com DB residentes na cidade ou no estado de São Paulo. Além disso, a não avaliação sistemática de outros alelos do *locus* B e de outros *loci* do HLA classe I, é possível causa de perda de associações entre outras variantes genéticas do HLA e desenvolvimento de DB ou de suas manifestações clínicas, o que nos leva ao ensejo de se planejar estudos futuros com maior número de participantes e com análise mais ampla do perfil genético de pacientes brasileiros com DB.

8. CONCLUSÕES

8- CONCLUSÕES

Conclui-se com este estudo que a frequência do gene *HLA-B*51* é maior em pacientes com DB, comparado a indivíduos saudáveis, sendo que a sua presença foi associada a um maior risco independente para o desenvolvimento da doença.

Além disso, identificou-se que o subtipo *HLA-B*51:01* foi o mais frequente tanto no grupo de pacientes como no grupo controle e que, a presença dele, não foi fator de risco para o desenvolvimento da DB. Nenhuma associação foi encontrada entre o *HLA-B*51:01* e as manifestações clínicas da DB.

Em contrapartida, o subtipo *HLA-B*51:08* foi encontrado somente no grupo de pacientes, não sendo possível definir associação entre a presença desse subtipo e a DB, uma vez que não foi encontrado o *HLA-B*51:08* entre indivíduos do grupo controle. A presença do *HLA-B*51:08* foi fator preditor para manifestações vasculares na DB.

Não foi encontrado o alelo *HLA-B*51:07* entre pacientes e controles na casuística deste estudo.

9. REFERÊNCIAS

9- REFERÊNCIAS

1. Mendes D, Correia M, Barbedo M, *et al.* Behçet's disease--a contemporary review. *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):178–88.
2. Davatchi F, Chams-Davatchi C, Shams H, *et al.* Behcet's disease: epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(1):57–65.
3. Yurdakul S, Yazici H. Behçet's syndrome. *Best Pr Res Clin Rheumatol.* 2008;22(5):793–809.
4. Koumantaki Y, Stavropoulos C, Spyropoulou M, *et al.* HLA-B*5101 in Greek patients with Behçet's disease. *Hum Immunol.* 1998;59(4):250–5.
5. Ishido T, Horita N, Takeuchi M, *et al.* Clinical manifestations of Behçet's disease depending on sex and age: results from Japanese nationwide registration. *Rheumatol.* 2017;56(11):1918–27.
6. Zouboulis CC, Kotter I, Djawari D, *et al.* Epidemiological features of Adamantiades-Behcet's disease in Germany and in Europe. *Yonsei Med J.* 1997;38:411–22.
7. Krause I, Rosen Y, Kaplan I, *et al.* Recurrent aphthous stomatitis in Behçet's disease: clinical features and correlation with systemic disease expression and severity. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(5):193–6.
8. Kastner D. Intermittent and periodic arthritic syndromes. In: *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology.* 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 1279–306.
9. O'Duffy J. Behcet's syndrome. In: *Primer on the Rheumatic Diseases.* 13th ed. Atlanta: Arthritis Foundation; 1993. p. 206.
10. Kaklamani VG, Vaiopoulos G KP. Behçet's Disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;27(4):197–217.
11. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Markomichelakis N, *et al.* Recurrent epididymo-orchitis in patients with Behcet's disease. *J Urol.* 2000;163(2):487–9.
12. Cho YH, Jung J, Lee KH, *et al.* Clinical features of patients with Behçet's disease and epididymitis. *J Urol.* 2003;170(4 I):1231–3.
13. Nussenblatt RB. Uveitis in Behçet's disease. *Int Rev Immunol.*

- 1997;14(1):67–79.
14. Evereklioglu C. Ocular Behçet disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22(6):508–16.
 15. Arevalo JF, Lasave AF, Al Jindan MY, *et al*. Uveitis in behçet disease in a tertiary center over 25 years: The kkesheh uveitis survey study group. *Am J Ophthalmol*. 2015;159(1):177–184.e2.
 16. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, *et al*. Behçet's disease. *N Engl J Med*. 1999;341(17):1284–91.
 17. Oliveira AC, Buosi AL, Dutra LA, *et al*. Behçet disease: clinical features and management in a Brazilian tertiary hospital. *J Clin Rheumatol*. 2011;17(8):416–20.
 18. Davies PG, Fordham JN, Kirwan JR, *et al*. The pathergy test and Behçet's syndrome in Britain. *Ann Rheum Dis*. 1984;43:70–3.
 19. Salvarani C, Pipitone N, Catanoso MG, *et al*. Epidemiology and clinical course of Behçet's disease in the Reggio Emilia area of Northern Italy: a seventeen-year population-based study. *Arthritis Rheum*. 2007;57(1):171–8.
 20. Bang D, Lee JH, Lee ES, *et al*. Epidemiologic and clinical survey of Behcet's disease in Korea: the first multicenter study. *J Korean Med Sci*. 2001;16(5):615–8.
 21. Yazici H, Tüzün Y, Pazarli H, *et al*. Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1984;43(6):783–9.
 22. Akmaz O, Erel A, Gurer M. Comparison of histopathologic and clinical evaluations of pathergy test in Behçet's disease. *Int J Dermatol*. 2000;39(2):121–5.
 23. Lebowitz, MG. Atlas of the skin and systemic disease. New York: Churchill Livingstone; 1995. 65–77 p.
 24. Dhahri R, Metoui L, Gharsallah I, *et al*. Joint manifestations in behcet's disease : a review of. 100 cases. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(3):A934.
 25. Merashli M, Eid RE, Uthaman I. A review of current management of vasculo-Behcet's. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(1):50–56.
 26. Fei Y, Li X, Lin S, *et al*. Major vascular involvement in Behçet's disease: a

- retrospective study of 796 patients. *Clin Rheumatol*. 2013;32(6):845–52.
27. Sarica-Kucukoglu R, Akdag-Kose A, Kayaball M, *et al*. Vascular involvement in Behçet's disease: a retrospective analysis of 2319 cases. *Int J Dermatol*. 2006;45(8):919–21.
 28. Ideguchi H, Suda A, Takeno M, *et al*. Characteristics of vascular involvement in Behçet's disease in Japan: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(4):S47-53.
 29. Houman MH, Neffati H, Braham A, *et al*. Behçet's disease in Tunisia. Demographic, clinical and genetic aspects in 260 patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(4 Suppl 45):S58-64.
 30. Tohmé A, Aoun N, El-Rassi B, *et al*. Vascular manifestations of Behçet's disease. Eighteen cases among 140 patients. *Jt Bone Spine*. 2003;70(5):384–9.
 31. Kuzu MA, Ozaslan C, Köksoy C, *et al*. Vascular involvement in Behçet's disease: 8-year audit. *World J Surg*. 1994;18(6):948–53.
 32. Duzgun N, Ates A, Aydintug OT, *et al*. Characteristics of vascular involvement in Behçet's disease. *Scand J Rheumatol*. 2006;35:65–8.
 33. Desbois AC, Wechsler B, Resche-Rigon M, *et al*. Immunosuppressants reduce venous thrombosis relapse in Behçet's disease. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2753–60.
 34. Seyahi E, Melikoglu M, Akman C, *et al*. Pulmonary artery involvement and associated lung disease in Behçet disease: a series of 47 patients. *Med*. 2012;91(1):35–48.
 35. Saadoun D, Wechsler B, Desseaux K, *et al*. Mortality in Behçet's disease. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2806–12.
 36. Davatchi F, Shahram F, Chams-Davatchi C, *et al*. Behcet's disease: from East to West . *Clin Rheumatol*. 2010;29(8):823–33.
 37. Ebert E. Gastrointestinal manifestations of Behçet's disease. *Dig Dis Sci*. 2009;542:201–7.
 38. al-Dalaan AN, al Balaa SR, el Ramahi K, *et al*. Behçet's disease in Saudi Arabia. *J Rheumatol*. 1994;21(4):658–61.
 39. Chen YC, Chang HW. Clinical characteristics of Behçet's disease in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2001;34(3):207–10.

40. Wang LY, Zhao DB, Gu J, *et al.* Clinical characteristics of Behçet's disease in China. *Rheumatol Int.* 2010;30(9):1191–6.
41. Singal A, Chhabra N, Pandhi D, *et al.* Behçet's disease in India: a dermatological perspective. 2013;79(2):199-204. . *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013;79(2):199–204.
42. Sachetto Z, Mahayri N, Ferraz RH, *et al.* Behçet's disease in Brazilian patients: demographic and clinical features. *Rheumatol Int.* 2012;32(7):2063–7.
43. Neves FS, Caldas CA, Lage LV, *et al.* Faraway from the silk route: demographic and clinical features of Behçet's disease in 106 Brazilian patients. *Clin Rheumatol.* 2009;28(5):543–6.
44. Bayraktar Y, Ozaslan E, Van Thiel DH. Gastrointestinal manifestations of Behcet's disease. *J Clin Gastroenterol.* 2000;30(2):144–54.
45. Grigg EL, Kane S, Katz S. Mimicry and deception in inflammatory bowel disease and intestinal behçet disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2012;8(2):103–12.
46. Lannuzel A, Lamaury I, Charpentier D, *et al.* Neurological manifestations of Behçet's disease in a Caribbean population: clinical and imaging findings. *J Neurol.* 2002;249(4):410–8.
47. Serdaroğlu, P. Behçet's disease and the nervous system. *J Neurol.* 1998;245:4197–205.
48. Oktem-Tanör O, Baykan-Kurt B, Gürvit IH, *et al.* Neuropsychological follow-up of 12 patients with neuro-Behçet disease. *J Neurol.* 1999;246(2):113–9.
49. Joseph FG, Scolding NJ. Neuro-Behçet's disease in Caucasians: a study of 22 patients. *Eur J Neurol.* 2007;14(2):174–80.
50. Kalra S, Silman A, Akman-Demir G, *et al.* Diagnosis and management of Neuro-Behçet's disease: international consensus recommendations. *J Neurol.* 2014;261(9):1662–76.
51. Borhani-Haghighi A, Samangoie S, Ashjazadeh N, *et al.* Neurological manifestations of Behçet's disease. *Saudi Med J.* 2006;27(10):1542–6.
52. Al-Araji A Kidd DP. Neuro-Behçet's disease: epidemiology, clinical characteristics, and management. *Lancet Neurol.* 2009;8(2):192–204.

53. Behcet's Disease Research Committee of Japan. Behcet's disease: guide to diagnosis of Behcet's disease. *Jpn J Ophthalmol*. 1974;18:291–4.
54. Mason RM, Barners CG. Behçet's syndrome with arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1969;28(2):95–103.
55. O'Duffy J. Criteres proposes pour le diagnostic de la maladie de Behcet et notes thérapeutiques. *Rev Med*. 1974;36:2371–9.
56. O'Neill TW, Rigby AS, Silman AJ, *et al*. Validation of the International Study Group criteria for Behçet's disease. *Br J Rheumatol*. 1994;33(2):115–7.
57. International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*. 1990;335(8697):1078–80.
58. International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR-ICBD). The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(3):338–47.
59. Davatchi F. Diagnosis/classification criteria for Behcet's disease. *Pathol Res Int*. 2012;2012:607921.
60. Yurdakul S, Yazici Y. Epidemiology of Behçet's syndrome and regional differences in disease expression. In: Yazici Y YH, editor. *Behçet's Syndrome*. New York: Springer; 2010. p. 35–53.
61. Yurdakul S, Günaydin I, Tüzün Y, *et al*. The prevalence of Behçet's syndrome in a rural area in northern Turkey. *J Rheumatol*. 1988;15(5):820–2.
62. Idil A, Gürler A, Boyvat A, *et al*. The prevalence of Behçet's disease above the age of 10 years. The results of a pilot study conducted at the Park Primary Health Care Center in Ankara, Turkey. *Ophthalmic Epidemiol*. 2002;9(5):325–31.
63. Azizlerli G, Köse AA, Sarica R, *et al*. Prevalence of Behçet's disease in Istanbul, Turkey. *Int J Dermatol*. 2003;42(10):803–6.
64. Cakir N, Dervis E, Benian O, *et al*. Prevalence of Behçet's disease in rural western Turkey: a preliminary report. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(4 Suppl 34):S53-5.

65. Akkoç N. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of Behçet's disease. *Best Pr Res Clin Rheumatol*. 2018;32(2):261–70.
66. Belem JMFM, Pereira RMR PM, *et al*. Epidemiologic Features of Systemic Vasculitides in the Southeast Region of Brazil. *JCR – J Clin Rheumatol*. 2019 (ahead for print), doi: 10.1097/RHU.0000000000001041
67. Gül A, Inanç M, Ocal L, *et al*. HLA-B51 negative monozygotic twins discordant for Behçet's disease. *Br J Rheumatol*. 1997;36(8):922–3.
68. Masatlioglu S, Seyahi E, Tahir Turanli E, *et al*. A twin study in Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(4 Suppl 60):S62-6.
69. Kapsimali VD, Kanakis MA, Vaiopoulos GA, *et al*. Etiopathogenesis of Behçet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations. *Clin Rheumatol*. 2010;29(11):1211–6.
70. Pineton de Chambrun M, Wechsler B, Geri G, *et al*. New insights into the pathogenesis of Behçet's disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):687–98.
71. Mendoza-Pinto C, García-Carrasco M, Jiménez-Hernández M, *et al*. Etiopathogenesis of Behcet's disease. *Autoimmun Rev*. 2010;9(4):241–5.
72. Mumcu G, Ergun T, Elbir Y, *et al*. Clinical and immunological effects of azithromycin in Behçet's disease. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(1):13–6.
73. Calgüneri M, Ertenli I, Kiraz S, *et al*. Effect of prophylactic benzathine penicillin on mucocutaneous symptoms of Behçet's disease. *Dermatology*. 1996;192(2):125–8.
74. Coit P, Sawalha AH. The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review. *Clin Immunol*. 2016;170:70–9.
75. Coit P, Mumcu G, Ture-Ozdemir F, *et al*. Sequencing of 16S rRNA reveals a distinct salivary microbiome signature in Behçet's disease. *Clin Immunol*. 2016;169:28–35.
76. Consolandi C, Turroni S, Emmi G, *et al*. Behçet's syndrome patients exhibit specific microbiome signature. *Autoimmun Rev*. 2015;14(4):269–76.
77. Kaya T. Genetics of Behçet's Disease. *Pathol Res Int*. 2012;2012:1–6.
78. Fietta P. Behçet's disease: familial clustering and immunogenetics. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(4):S96-105.

79. Piga M, Mathieu A. Genetic susceptibility to Behcet's disease: role of genes belonging to the MHC region. *Rheumatol.* 2011;50(2):299–310.
80. Gül A, Hajeer AH, Worthington J, *et al.* Evidence for linkage of the HLA-B locus in Behçet's disease, obtained using the transmission disequilibrium test. *Arthritis Rheum.* 2001;44(1):239–40.
81. de Menthon M, Lavalley MP, Maldini C, *et al.* HLA-B51/B5 and the risk of Behçet's disease: a systematic review and meta-analysis of case-control genetic association studies. *Arthritis Rheum.* 2009;61(10):1287–96.
82. McGonagle D, Aydin SZ, Gül A, *et al.* 'MHC-I-opathy'-unified concept for spondyloarthritis and Behçet disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(12):731–40.
83. Middleton D, Menchaca L, Rood H, *et al.* New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens.* 2003;61(5):403–7.
84. Takeuchi M, Kastner DL, Remmers EF. The immunogenetics of Behçet's disease: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:137–48.
85. Pirim I, Atasoy M, Ikbali M, *et al.* HLA class I and class II genotyping in patients with Behcet's disease: a regional study of eastern part of Turkey. *Tissue Antigens.* 2001;64(3):293–7.
86. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, *et al.* HLA and tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms in ocular Behcet's disease. *Tissue Antigens.* 1999;54(3):264–72.
87. Kötter I, Günaydin I, Stübiger N, *et al.* Comparative analysis of the association of HLA-B*51 suballeles with Behçet's disease in patients of German and Turkish origin. *Tissue Antigens.* 2001;58(3):166–70.
88. Paul M, Klein T, Krause I, *et al.* Allelic distribution of HLA-B*5 in HLA-B5-positive Israeli patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens.* 2001;58(3):185–6.
89. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, *et al.* Sequencing-based typing of HLA-B*51 alleles and the significant association of HLA-B*5101 and -B*5108 with Behçet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens.* 2002;59(2):118–21.
90. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, *et al.* Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behçet's disease.

- Arthritis Rheum. 1999;42(9):1961–6.
91. Yabuki K, Ohno S, Mizuki N, *et al.* HLA class I and II typing of the patients with Behçet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens*. 1999;54(3):273–7.
 92. Mizuki N, Ohno S, Ando H, *et al.* A strong association between HLA-B*5101 and Behçet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens*. 1997;50(1):57–60.
 93. Mizuki N, Inoko H, Ando H, *et al.* Behçet's disease associated with one of the HLA-B51 subantigens, HLA-B* 5101. *Am J Ophthalmol*. 1993;116(4):406–9.
 94. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, *et al.* HLA-B*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B*5101 with Japanese patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 2001;58(3):181–4.
 95. Kera J, Mizuki N, Ota M, *et al.* Significant associations of HLA-B*5101 and B*5108, and lack of association of class II alleles with Behçet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens*. 1999;54(6):565–71.
 96. Takemoto Y, Naruse T, Namba K, *et al.* Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 2008;72(4):347–53.
 97. Gül A. Genetics of Behçet's disease: lessons learned from genomewide association studies. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(1):56–63.
 98. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, *et al.* Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease. *Nat Genet*. 2010;42(8):698–702.
 99. Mizuki N, Meguro A, Ota M, *et al.* Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci . *Nat Genet*. 2010;42(8):703–6.
 100. Fei Y, Webb R, Cobb BL, *et al.* Identification of novel genetic susceptibility loci for Behçet's disease using a genome-wide association study. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R66.
 101. Hou S, Yang Z, Du L, *et al.* Identification of a susceptibility locus in STAT4 for Behçet's disease in Han Chinese in a genome-wide association study. *Arthritis Rheum*. 2012;64(12):4104–13.

102. Lee YJ, Horie Y, Wallace GR, *et al.* Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(9):1510–6.
103. Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, *et al.* Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet.* 2013;45(2):202–7.
104. Kappen JH, Medina-Gomez C, van Hagen PM, *et al.* Genome-wide association study in an admixed case series reveals IL12A as a new candidate in Behçet disease. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119085.
105. Hughes T, Coit P, Adler A, *et al.* Identification of multiple independent susceptibility loci in the HLA region in Behçet's disease. *Nat Genet.* 2013;45(3):319–24.
106. Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Strange A, Capon F, Spencer CC, *et al.* A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet.* 2010;42(11):985–90.
107. Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, *et al.* Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet.* 2011;43(8):761–7.
108. Maldini C, Lavalley MP, Cheminant M, *et al.* Relationships of HLA-B51 or B5 genotype with Behçet's disease clinical characteristics: systematic review and meta-analyses of observational studies. *Rheumatol.* 2012;51(5):887–900.
109. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N, *et al.* The long-term mortality and morbidity of Behçet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Med.* 2003;82(1):60–76.
110. Akman-Demir G, Serdaroglu P, Taşçi B. Clinical patterns of neurological involvement in Behçet's disease: evaluation of 200 patients. The Neuro-Behçet Study Group. *Brain.* 1999;122:2171–82.
111. &hla_locus=&hla_allele1=B*51&hla_allele2=B*51&hla_selection=&hla_p

- op_selection=&hla_population=&hla_country=Brazil&hla_dataset=&hla_region=&hla_ethnic=&hla_study=&hla_order=order_1&hla_sample_size_pattern=equal&hla_sample_size=&hla_sample_year_pattern=equ H allele frequencies. net/hla6006a. asp?hla_locus_type=Classica. No Title.
112. Middleton D, Williams F, Meenagh A, *et al.* Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol.* 2000;61(10):1048–52.
 113. Lázaro AM, Moraes ME, Marcos CY, *et al.* Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. *Hum Immunol.* 1999;60(11):1138–49.
 114. Meguro A, Inoko H, Ota M, *et al.* Genetics of Behçet disease inside and outside the MHC. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):747–54.
 115. Kang EH, Park JW, Park C, *et al.* Genetic and non-genetic factors affecting the visual outcome of ocular Behcet's disease. *Hum Immunol.* 2013;74(10):1363–7.
 116. Saruhan-Direskeneli G, Hughes T, Aksu K, *et al.* Identification of multiple genetic susceptibility loci in Takayasu arteritis. *Am J Hum Genet.* 2013;93(2):298–305.
 117. Park KS, Park JS, Nam JH, *et al.* HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease. *Tissue Antigens.* 2007;69(2):139–44.
 118. Leccese P, Alpsoy E. Behçet's Disease: An Overview of Etiopathogenesis. *Front Immunol.* 2019;10:1067.
 119. Afkari B, Babaloo Z, Dolati S, *et al.* Molecular analysis of interleukin-10 gene polymorphisms in patients with Behçet's disease. *Immunol Lett.* 2018;194:56–61.
 120. Xavier JM, Shahram F, Davatchi F, *et al.* Association study of IL10 and IL23R-IL12RB2 in Iranian patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2761–72.
 121. Jiang Z, Yang P, Hou S, *et al.* IL-23R gene confers susceptibility to Behcet's disease in a Chinese Han population. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(7):1325–8.
 122. Nogueira O. Tanto preto quanto branco: estudo de relações raciais. São Paulo. Queiroz TA, editor. São Paulo: Biblioteca básica de ciências

- sociais. Série 1a, Estudos brasileiros; 1985. 133 p.
123. Krause I, Weinberger A. Behçet's disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20:82–7.
 124. Krause I, Mader R, Sulkes J, *et al*. Behçet's disease in Israel: the influence of ethnic origin on disease expression and severity. *J Rheumatol*. 2001;28(5):1033–6.
 125. Sanchez Burson J, Grandal Y, Mendoza M, *et al*. Behçet Syndrome in Spain. In: Olivieri I, Salvarani C CF, editor. 8th International Congress on Behçet's Disease. 1998. p. 102.
 126. Kirino Y, Nakajima H. Clinical and Genetic Aspects of Behçet's Disease in Japan. *Intern Med*. 2019;58(9):1199–207.
 127. Krause I, Yankevich A, Fraser A, *et al*. Prevalence and clinical aspects of Behcet's disease in the north of Israel. *Clin Rheumatol*. 2007;26(4):555–60.
 128. Assaad-Khalil SH, Kamel AS, Ismail E. Starting a regional registry for patients with Behçet's disease in North West Nile Delta region in Egypt. M H, editor. 1997. 173-6 p.
 129. Jankowski J, Crombie I, Jankowaki R. Behçet's syndrome in Scotland. *Postgr Med J*. 1992;68(801):566–70.
 130. MA Chamberlain. Behcet's syndrome in 32 patients in Yorkshire. *Ann Rheum Dis*. 1977;36(6):491–9.
 131. Ambresin A, Tran T, Spertini F, *et al*. Behçet's disease in Western Switzerland: epidemiology and analysis of ocular involvement. *Ocul Immunol Inflamm*. 2002;10(1):53–63.
 132. Ek L, Hedfors E. Behçet's disease: a review and a report of 12 cases from Sweden. *Acta Derm Venereol*. 1993;73(4):251–4.
 133. Calamia KT, Wilson FC, Icen M, *et al*. Epidemiology and clinical characteristics of behcet's disease in the us: A population-based study. *Arthritis Care Res*. 2009;61(5):600–4.
 134. Arber N, Klein T, Meiner Z, *et al*. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1991;50(6):351–3.
 135. Baricordi OR, Sensi A, Pivetti-Pezzi P, *et al*. Behcet's disease associated

- with HLA-B51 and DRw52 antigens in Italians. *Hum Immunol.* 1986;17(3):297–301.
136. Choukri F, Chakib A, Himmich H, *et al.* HLA-B*51 and B*15 alleles confer predisposition to Behçet's disease in Moroccan patients. *Hum Immunol.* 2001;62(2):180–5.
 137. Bettencourt A, Pereira C, Carvalho L, *et al.* New insights of HLA class I association to Behçet's disease in Portuguese patients. *Tissue Antigens.* 2008;72(4):379–82.
 138. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, *et al.* HLA class I genotyping including HLA-B*51 allele typing in the Iranian patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens.* 2001;57(5):457–62.
 139. González-Escribano MF, Rodríguez MR, Walter K, *et al.* Association of HLA-B51 subtypes and Behçet's disease in Spain. *Tissue Antigens.* 1998;52(1):78–80.
 140. Beiguelman B. A interpretação genética da variabilidade humana. Ribeirão Preto: SBG; 2008. p44.
 141. Cavararo R. Características étnico-raciais da população: um estudo das categorias da classificação de cor ou raça. Brasil: IBGE; 2011. p49.
 142. Hatemi G, Yazici Y, Yazici H. Behçet's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;39(2):245–61.
 142. Demirseren DD, Ceylan GG, Akoglu G, *et al.* HLA-B51 subtypes in Turkish patients with Behçet's disease and their correlation with clinical manifestations. *Genet Mol Res.* 2014;13(3):4788–96.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Avaliação da prevalência de HLA-B51 e seus principais alelos em paciente brasileiros com doença de Behçet

Nome do(a) paciente: _____

RG-HSP: _____

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que visa pesquisar o gene do HLA-B51 e alguns de seus subtipos em pacientes com doença de Behçet e em controles. Depois verificaremos se há associação entre sintomas da doença de Behçet a presença de algum desses genes.

A doença de Behçet é uma vasculite que leva à inflamação de vasos sanguíneos de diferentes tamanhos e se manifesta por aftas, úlceras em genitais, manchas na pele, inflamação no olho e no sistema nervoso em diferentes combinações. O HLA-B51 é um gene encontrado em pacientes com doença de Behçet em diversos países, principalmente na Turquia, em países do Oriente Médio e no Japão. A presença desse gene leva a um maior risco de se ter a doença de Behçet. Entretanto, nem todos os indivíduos portadores do gene HLA-B51 desenvolvem a doença de Behçet, pois esse gene tem diversos subtipos. Entre eles, o HLA-B510101 e o HLA-B5108 levam a um risco maior de se desenvolver a doença de Behçet enquanto o HLA-B5107 tem efeito protetor. No Brasil, o HLA-B51 é encontrado em pessoas saudáveis na população, mas ainda não se sabe se esse gene ou seus subtipos também são encontrados em pacientes brasileiros com doença de Behçet ou se eles aumentam o risco de se desenvolver a doença.

Neste estudo, os pacientes serão entrevistados, examinados e serão colhidos 5 ml de sangue em veia de antebraço para a pesquisa genética. Poderá haver algum desconforto transitório no local de coleta do sangue. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado

somente para esta pesquisa. O presente estudo não irá interferir no acompanhamento e nas medicações prescritas e obtidas no Ambulatório de Vasculites. Assim, trata-se de um trabalho científico de coleta de dados e análise dos mesmos em que não serão testadas ou experimentadas provas diagnósticas ou terapêuticas que não estejam consagradas pela literatura científica mundial.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Os pacientes terão o direito de serem atualizados quanto a resultados que forem do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

O(a) Sr(a) poderá tirar quaisquer dúvidas sobre o estudo e os exames que serão utilizados, entrando em contato com: Dr Alexandre Wagner Silva de Souza na Disciplina de Reumatologia da UNIFESP- Rua Pedro de Toledo, 650 3º andar CEP: 04023-900 - Tel.: (11) 5576-4239. Podem decidir participar ou não sabendo que isso não interfere no seu tratamento, assim como podem sair do estudo caso seja esse seu desejo. Se o participante tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – CJ 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br. Esse termo foi elaborado em duas vias devidamente assinadas, sendo que uma ficará com o Sr (a). e a outra conosco.

Acredito ter sido adequadamente informado(a) sobre o estudo “Avaliação da prevalência de HLA-B51 e seus principais alelos em paciente brasileiros com doença de Behçet”. Eu discuti com o Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar

quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Assinatura do paciente / Representante legal

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO CONTROLE

Projeto: Avaliação da prevalência de HLA-B51 e seus principais alelos em paciente brasileiros com doença de Behçet

Nome do(a) paciente: _____

RG-HSP: _____

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar se pacientes com doença de Behçet e indivíduos saudáveis da população brasileira apresentam um gene conhecido como HLA-B51 e alguns de seus subtipos. A doença de Behçet é uma doença que leva à inflamação de vasos sanguíneos de diferentes tamanhos e se manifesta por aftas, úlceras em genitais, manchas na pele, inflamação no olho e no sistema nervoso em diferentes combinações. O HLA-B51 é um gene encontrado em pacientes com doença de Behçet em diversos países, principalmente na Turquia, em países do Oriente Médio e no Japão. A presença desse gene leva a um maior risco de se ter a doença de Behçet. Entretanto, nem todos os indivíduos portadores do gene HLA-B51 desenvolvem a doença de Behçet, pois esse gene tem diversos subtipos. Entre eles, o HLA-B510101 e o HLA-B5108 levam a um risco maior de se desenvolver a doença de Behçet enquanto o HLA-B5107 tem efeito protetor. No Brasil, o HLA-B51 também é encontrado em pessoas saudáveis na população, mas ainda não se sabe se esse gene ou seus subtipos também são encontrados em pacientes brasileiros com doença de Behçet ou se eles aumentam o risco de se desenvolver a doença.

Nós lhe convidamos a participar dessa pesquisa como indivíduo saudável integrante do grupo controle, se você aceitar participar, serão coletados 5ml de sangue durante sua coleta inicial para a doação sanguínea. Esse material será destinado à análise genética para o estudo que visa

pesquisar o gene do HLA-B51 e alguns de seus subtipos em pacientes com doença de Behçet e indivíduos saudáveis.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Assim, trata-se de um trabalho científico de coleta de dados e análise dos mesmos em que não serão testadas ou experimentadas provas diagnósticas ou terapêuticas que não estejam consagradas pela literatura científica mundial.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Os pacientes terão o direito de serem atualizados quanto a resultados que forem do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

O(a) Sr(a) poderá tirar quaisquer dúvidas sobre o estudo e os exames que serão utilizados, entrando em contato com: Dr Alexandre Wagner Silva de Souza na Disciplina de Reumatologia da UNIFESP- Rua Pedro de Toledo, 650 3º andar CEP: 04023-900 - Tel.: (11) 5576-4239. Podem decidir participar ou não sabendo que isso não interfere no seu tratamento, assim como podem sair do estudo caso seja esse seu desejo. Se o participante tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – CJ 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br. Esse termo foi elaborado em duas vias devidamente assinadas, sendo que uma ficará com o Sr (a). e a outra conosco.

Acredito ter sido adequadamente informado(a) sobre o estudo “Avaliação da prevalência de HLA-B51 e seus principais alelos em paciente brasileiros com doença de Behçet”. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que

tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Assinatura do paciente / Representante legal

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 3

FICHA DE AVALIAÇÃO - PACIENTES

Projeto: Avaliação da frequência de HLA-B51 e seus principais alelos em paciente brasileiros com doença de Behçet

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

RH-HSP: _____ Nº no estudo: _____

Data do diagnóstico: _____ Data da avaliação: _____

Sexo: _____ Idade ao estudo: _____

Cor da pele: _____

MANIFESTAÇÕES

Úlceras orais recorrentes ()

Úlceras genitais ()

Envolvimento cutâneo ()

Lesões eritema nodoso-like ()

Lesões acneiformes ()

Envolvimento articular ()

Artralgias () Artrite ()

Envolvimento ocular ()

Panuveíte () Uveíte anterior com hipópio ()

Uveíte posterior () Vasculite retiniana ()

Envolvimento neurológico ()

Parenquimatoso () Descrição: _____

Não parenquimatoso () Descrição: _____

Envolvimento neurológico recorrente () Número de recidivas: _____

Envolvimento vascular ()

Tromboflebite superficial ()

Trombose venosa () Sítio: _____

Aneurismas () Sítios: _____

Envolvimento do TGI ()

Descrição: _____

Outras manifestações:

TRATAMENTO

Colchicina () Colchicina + penicilina ()

Talidomida () Dapsona ()

Imunossupressores ()

Descrição: _____

Imunobiológicos ()

Descrição: _____